

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

**Estudio y caracterización de cepas de parvovirus canino en
España**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Silvia Penelo Hidalgo

Directores

**Gloria Santurde Sánchez
Isabel Simarro Fernández**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO SANIDAD ANIMAL



ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE PARVOVIRUS
CANINO EN ESPAÑA

TESIS DOCTORAL

SILVIA PENELO HIDALGO

MADRID 2015

MEMORIA PRESENTADA POR DÑA. SILVIA PENELO HIDALGO PARA OBTAR AL GRADO
DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

MADRID, 6 DE NOVIEMBRE DE 2015

Dña. Gloria Santurde Sánchez, Profesor contratado doctor del Departamento de Sanidad Animal y Dña. Isabel Simarro Fernandez, Catedrática de Universidad de Departamento de Sanidad Animal, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada “Estudio y Caracterización de Cepas de Parvovirus Canino en España”, que presenta el Licenciado en Veterinaria por la Universidad Complutense de Madrid Dña. Silvia Penelo Hidalgo, para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en las dependencias del Departamento de Sanidad Animal y del servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Clínico Veterinario UCM bajo nuestra dirección y cumple todas las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

De acuerdo con la normativa vigente, firmamos el presente certificado, autorizando su presentación como directores de la mencionada tesis doctoral en Madrid, a 6 de noviembre de 2015.

Fdo. Gloria Santurde Sánchez

Fdo. Isabel Simarro Fernandez

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin mis tutoras, la Dra. Dña. Gloria Santurde Sánchez y la Dra. Dña. Isabel Simarro Fernandez. Gracias por todos los conocimientos aportados, por la paciencia durante todo el trabajo y por el apoyo durante el mismo.

Mis más sinceros agradecimientos a los técnicos de laboratorio del servicio de microbiología y parasitología del Hospital Veterinario Complutense, Ernesto, Mariluz y Susana, por su ayuda siempre que lo he necesitado y su apoyo a lo largo de los años.

A todos los compañeros que me han ayudado con la recogida de muestras para este trabajo.

Muchas gracias a todas las personas que han pasado por mi vida, estén actualmente en ella o no, y también a aquellas que, por muchas vueltas que dé el destino, no nos volveremos a encontrar porque ya no están entre nosotros. Todos y cada uno de ellos han dejado una impronta en mí que me han hecho crecer como persona.

Gracias a los animales que me han demostrado su bondad de corazón y que me hacen levantarme cada día para hacer el trabajo que más me gusta.

Y por último, pero el más importante, gracias a mis padres por todo lo que me han dado y por apoyarme incondicionalmente siempre en todas mis decisiones, fueran acertadas o no.

INDICE DE CONTENIDO:

LISTADO DE TABLAS	I
LISTADO DE FIGURAS	IV
LISTADO DE ABREVIATURAS	VI
I.- RESUMEN.....	VIII
II.- SUMMARY	XII
III.- INTRODUCCIÓN.....	1
1. Taxonomía y clasificación.....	4
1.1. Subfamilia Parvovirinae.....	4
1.2. Subfamilia Densovirinae	5
2.1. Morfología vírica	7
2.2. Cápside	7
2.1.1. Estructura	7
2.1.2. Proteínas de la cápside	9
2.3. El genoma vírico	11
2.4. Ciclo replicativo	12
2. El parvovirus canino.....	15
3.1. Origen del parvovirus canino	15
3.2. Evolución CPV-2	17
3.3. Dinámica de emergencia	19
3.4. CPV-2c.....	20
3.5. Distribución de las variantes antigénicas a nivel mundial	21
3.6. Rango de hospedadores	22
3.7. Potencial patógeno de las distintas cepas de parvovirus.....	23
3.8. Parvovirosis canina: la enfermedad	24
3.8.1. Patogenia	25
3.8.2. Signos clínicos.....	26
3.8.2.1. Gastroenteritis	26
3.8.2.2. Cuadro neurológico	29
3.8.2.3. Miocarditis	29
3.8.2.4. Enfermedad cutánea	30
3.8.2.5. Portadores asintomáticos.....	30
3.8.3 Anatomía patológica e histopatología	30
3.8.4 Diagnóstico	31
3.8.4.1. Métodos tradicionales	31
A. Inmunocromatografía	31
B. Microscopía electrónica.....	32

C. Hemoaglutinación	33
D. Aislamiento vírico	33
3.8.4.2. Métodos moleculares	33
3.8.5. Caracterización de la cepa vírica	34
3.8.5.1. Métodos tradicionales.....	34
3.8.5.2. Métodos moleculares	35
3.8.6. Tratamiento	36
3.8.7. Vacunación y prevención	40
3.8.7.1. Protección cruzada	42
IV.- OBJETIVOS	45
V.- MATERIALES Y MÉTODOS	49
1. Estudio de casos clínicos	51
2. Muestras empleadas, procesamiento inicial y almacenamiento.....	51
3. Evaluación de la sintomatología clínica.....	52
4. Origen y características de las muestras empleadas	53
5. Líneas celulares	54
5.1. Descongelar líneas celulares estables	54
5.2. Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares CRFK y MDCK.....	54
5.3. Virus empleados	55
5.4. Producción de virus	56
5.5. Titulación de virus	56
5.6. Obtención, preparación y almacenamiento de las muestras.....	57
5.7. Adaptación al crecimiento en las líneas celulares CRFK y MDCK	58
6. Identificación de la infección mediante IFD	58
7. Identificación de la infección mediante inmunocromatografía	59
8. Identificación de la infección mediante ELISA rápido	59
9. Identificación de la infección mediante PCR	60
9.1. Extracción del DNA para PCR	60
9.2. Realización de la PCR convencional	61
9.3. Purificación y secuenciación de las muestras	61
10. Estudio estadístico	63
VI.- RESULTADOS.....	65
1. Selección de muestras	67
2. Pruebas de screening para la identificación mediante inmunocromatografía y/o ELISA rápido.....	69
3. Estudio comparativo de los diferentes test inmonocromatográficos y/o ELISA rápido	69
4. Aislamiento vírico en cultivos celulares e identificación de la infección mediante IFI.....	72
5. PCR	73
6. Análisis de los resultados positivos a los test	

inmunocromatográficos con respecto a la técnica de referencia (PCR)	76
7. Comparación de resultados entre la técnica de referencia y distintos test inmunocromatográficos y ELISA	76
8. Caracterización del virus presente en las muestras.....	79
9. Descripción estadística de la población enferma	87
9.1. Edad	88
9.2. Sexo	89
9.3. Raza	90
9.4. Estado de vacunación frente a CPV	91
9.5. Clasificación patógena de los animales	94
10. Análisis estadístico en relación a la cepa vírica secuenciada	97
10.1. Distribución de las cepas víricas según los años de presentación	97
10.2. Edad de los animales afectados	98
10.3. Vacunación.....	101
10.4. Sintomatología	105
11. Parvovirus canino en otras especies	116
VII. DISCUSIÓN	117
1. Subtipos y distribución	121
2. Rango de hospedador	124
3. Métodos de detección de CPV	125
4. Potencial patógeno de las distintas cepas	130
5. Factores de riesgo asociados a la presencia de CPV	132
5.1. Edad.....	132
5.2. Raza	132
5.3. Sexo	133
5.4. Vacunación	133
6. Parvovirus en otras especies animales	135
6.1. Parvovirus felino	136
6.2. Parvovirus en hurones	137
6.3. Parvovirus en carnívoros salvajes	137
VIII. CONCLUSIONES	145
IX. BIBLIOGRAFÍA	149

LISTADO DE TABLAS:

Tabla 1.- Modelo de valoración clínica de los casos origen de las muestras	53
Tabla 2.- Sintomatología concomitante en animales clínicamente enfermos de parvovirus canino	53
Tabla 3.- número de casos positivos a parvovirus canino agrupados por años.....	68
Tabla 4.- Tipo de muestras procesadas	68
Tabla 5.- Resultados de los test comerciales empleados	69
Tabla 6.- Sensibilidad y especificidad de los test comerciales empleados	72
Tabla 7.- Resultados de los distintos test rápidos en comparación con la PCR	78
Tabla 8.- Referencia de las muestras seleccionadas para secuenciación	80
Tabla 9.- CPV-2a	84
Tabla 10.- CPV-2b	85
Tabla 11.- CPV-2c	86
Tabla 12.- FLPV	87
Tabla 13.- Otras mutaciones	87
Tabla 14.- Distribución de la población de perros con sintomatología clínica por CPV según su edad	88
Tabla 15.- Distribución de la población de perros con CPV según el sexo	89
Tabla 16.- Clasificación de las razas según su peso medio adulto	90
Tabla 17.- Distribución de la población de perros con CPV en función de la raza.....	91
Tabla 18.- Estado de vacunación frente a CPV según edad	92
Tabla 19.- Distribución de la población de perros con CPV en función de su estado de vacunación	92
Tabla 20.- Distribución de la población canina con CPV en función de la vacunación dentro de los grupos de edad	94
Tabla 21.- Clasificación patógena según sintomatología de los animales del estudio...	95
Tablas de contingencia.....	98
- Tabla 22.- Distribución de la cepa vírica en función de los años de presentación..	98

- Tabla 23.- Distribución de la cepa vírica en función de la edad de los animales afectados	98
- Tabla 24.- Estado de vacunación de los animales positivos a PCR	102
- Tabla 25.- Distribución de la cepa vírica en función del estado de vacunación del animal	103
- Tabla 26.- Animales asintomáticos incluidos en los positivos a PCR ..	105
- Tabla 27.- Animales con sintomatología digestiva incluidos en los positivos a PCR.....	106
- Tabla 28.- Distribución de la cepa vírica en función de la presentación de sintomatología digestiva	108
- Tabla 29.- Distribución de la cepa vírica en función de la presentación de sintomatología digestiva junto con respiratoria concomitante	110
- Tabla 30.- Distribución de la cepa vírica en función de la presentación de sintomatología digestiva junto con neurológica concomitante	112
- Tabla 31.- Distribución de la cepa vírica en función de la ausencia de síntomas.....	114
Tabla 32.- Cepas de parvovirus halladas en otras especies animales	116

LISTADO DE FIGURAS:

1.- Estructura tridimensional del parvovirus	8
2.- Internalización el virus mediante procesos de endocitosis	12
3.- Replicación de los parvovirus	14
4.- Test inmunocomatográficos / ELISA empleados para el disgnóstico de CPV	70
5.- Cultivos celulares MDCK y CRFK con marcaje citoplasmico y nuclear en IFI	72
6.- Resultados PCR	73
7.- Sensibilidad de los distintos test inmunocromatográficos frente a PCR.....	76
8.- Sensibilidad de los distintos test en relación a la PCR	77
9.- Ejemplo de cromatograma correspondiente a una de las muestras secuenciadas.....	81
10.- Ejemplo de alineamiento multiple de secuenciación mediante el algoritmo Clustal W de la herramienta Mega 6	82
11.- Animales clasificados por rangos de edad	88
12.- Distribución de la población de perros con CPV según el sexo	89
13.- Estado de vacunación frente a CPV según edad.....	91
14.-Distribución de la población de perros con CPV en función de su estado de vacunación..	93
15.-Distribución de la población canina con CPV en función de la vacunación dentro de los grupos de edad	94
16.- clasificación patógena según sintomatología de los animales del estudio.....	96

LISTADO DE ABREVIATURAS

Ala	Alanina
Asp	Aspartato
bp	Pares de bases
CPV-1	Parvovirus Canino tipo 1
CPV-2	Parvovirus Canino tipo 2
CRFK	Células de riñón felino Crandell-Rees
DNA	Ácido dexoxiribonucleico
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FLPV	Virus de la panleucopenia felina
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
HI	Inhibición de la hemaglutinación
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Met	Metionina
MCV	Virus diminuto de los caninos
MEV	Virus de la enteritis del Vison
NCBI	Centro Nacional de Información sobre Biotecnología
NS1	Proteína no estructural 1
NS2	Proteína no estructural 2
ORF	Marco de lectura abierta
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido desoxirribonucleico
Ser	Serina
ssDNA	DNA de cadena simple
TfR	Receptor de la transferrina
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina

UCM

Universidad Complutense de Madrid

Val

Valina

VP

Proteína de la cápside viral



I.- RESUMEN



I. Resumen:

El parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) es uno de los principales agentes etiológicos causantes de gastroenteritis severas en perros. Este virus es pequeño (alrededor de 20nm), sin envuelta, con ADN monocatenario. La cápside virica está compuesta principalmente por la proteína VP2, siendo los cambios de aminoácidos en la secuencia de esta proteína los causantes de la variabilidad genética y antigénica, determinando además el rango de hospedador y el tropismo por determinados tejidos. CPV es muy similar al virus de la panleucopenia felina (FLPV), junto con el que se encuentra clasificado dentro del género Parvoviridae. Ambos son idénticos en un 98% de su secuencia, diferenciándose sólo en la secuencia de 2 aminoácidos de la proteína de la cápside viral VP2. Dentro de este género se encuentran también el virus de la enteritis de los visones (MEV), el parvovirus de los mapaches (RPV) y el parvovirus del zorro azul (BFPV). Se ha postulado que CPV puede provenir de un mutante derivado del parvovirus felino o de algún carnívoro salvaje.

CPV-2 emergió a finales de la década de los 70 del siglo pasado, produciendo brotes gastroentericos graves. Tras su emergencia, CPV-2 dio lugar a 2 variantes antigénicas, CPV-2a y CPV-2b, que fueron remplazando progresivamente la cepa original. En el año 2000 se detectó en Italia una nueva variante antigénica, CPV-2c. Esta variante se extendió rápidamente por distintos países.

Las distintas variantes antigénicas difieren del original CPV-2 en pocos aminoácidos en la proteína VP2 de la cápside. Las diferencias entre CPV-2a, 2b y 2c residen principalmente en el residuo 426 de la cápside viral, en el que se encuentra asparagina, ácido aspártico o ácido glutámico respectivamente.

Las nuevas variantes antigénicas parecen tener un mayor potencial patógeno en perros, así como un rango de hospedadores más amplio, causando infección y enfermedad en gatos. Algunos estudios han sugerido que la cepa predominante en muchos países es actualmente CPV-2c. Los estudios epidemiológicos realizados

parecen indicar que produce un cuadro clínico más severo en animales adultos, incluso en aquellos que se encuentran correctamente vacunados.

En nuestro país existe sólo un estudio sobre la aparición y distribución de las diferentes cepas en España, estudiando tan sólo si la cepa CPV-2c se encuentra circulando en nuestro país. En el presente estudio se han evaluado las distintas cepas de parvovirus presentes en nuestra área geográfica y su aparición cronológica a lo largo de 10 años (2004-2013). El diagnóstico de parvovirus mediante métodos tradicionales en animales con sintomatología clínica compatible con la enfermedad ha demostrado una baja sensibilidad, por lo que uno de los objetivos de este estudio es la elección de un test rápido de uso rutinario para la detección de la presencia de virus sobre muestra biológica. En una última fase se realizará la identificación y caracterización de cepas de parvovirus circulantes en nuestro entorno geográfico, a partir de las muestras incluidas en el estudio.

-



II.- SUMMARY



II. Summary:

Canine parvovirus type 2 (CPV-2) is the etiological agent of a severe gastroenteritis of dogs. CPV is an small, non-enveloped, single stranded DNA genome virus. The genome contain two open reading frame (ORF), that encodes 2 structural proteins (VP1 y VP2) and another 2 non-structural proteins (NS1 and NS2). Parvovirus capsids are highly antigenic and play major roles in determining viral host ranges and tissue tropisms. The virus is very similar to feline panleukopenia (also a parvovirus); they are 98% identical, differing only in two amino acids in the viral capsid protein VP2. It is also highly similar to mink enteritis, and the parvoviruses of raccoons and foxes. It is suggested that CPV2 can be a mutant of an unidentified parvovirus derived from feline parvovirus (FLPV) or from some wild carnivore.

CPV-2 emerged in late 1970s causing severe outbreaks in kennels, veterinary hospitals and dog shelters worldwide. Soon after its emergence, CPV-2 gave rise to two antigenic variants, CPV-2a and CPV-2b, which replaced progressively the original type. In 2000, a new antigenic variant, CPV-2c, was first detected in Italy and several studies indicated that it rapidly spread to several countries. The antigenic variants differ from the original type CPV-2 for a few amino acids in the VP2 protein, whereas genetic differences among the variants are determined only by residue 426, with types 2a, 2b, and 2c displaying Asn, Asp, and Glu, respectively. In comparison to the original type CPV-2, the antigenic variants seem to increase pathogenicity in dogs and expand host range, being able to infect and cause disease in cats. Several studies indicated that the new type CPV-2c is becoming prevalent worldwide.

Epidemiological survey indicates that and is often associated to severe disease in adult dogs and also in dogs that have completed the standard vaccination protocols, including vaccines against parvovirus infection.

There is only a poor study of appearance and distribution of the different strains presents in our country, that only determine if CPV-2c is present in our country or not. At the present study we want to demonstrate the different strains circulating at our area along 10 years (2004-2013). Diagnosis of CPV infection in animals with

clinical symptoms suitable for parvovirus by traditional methods has been shown to be poorly sensitive and it is necessary the development of most rapid and accurate method of detection of canine parvovirus infection. Ultimately, the identificación and characterization of circulating strains of parvovirus in our geographical area was carried out, from the samples included in this study.

III.- INTRODUCCIÓN

III. Introducción:

Las diarreas neonatales en la especie canina forman parte de un síndrome de etiología diversa derivada de la interacción entre el hospedador, el entorno y los agentes infecciosos implicados.

Entre los factores relacionados con el hospedador se encuentran:

- La susceptibilidad individual.
- La edad del animal.
- El nivel de anticuerpos maternos, que depende a su vez de la eficacia del aporte inmunitario materno en cuanto a la cantidad, momento de la ingestión, composición y absorción del calostro ingerido por el cachorro, etc.

Entre los factores que influyen en el entorno del animal se encuentran los factores ambientales y de manejo: alojamiento, concentración de animales, medidas higiénico-sanitarias, alimentación, etc. (Smith-Carr y col., 1997; McCaw, Hoskins, 2006; Savigny, Macintire, 2007).

En cuanto a los agentes causantes de las diarreas neonatales caninas, se debe tener en cuenta que casi siempre se trata de infecciones mixtas, en las que intervienen varios agentes enteropatógenos, que pueden intervenir simultáneamente, o bien sucederse de forma escalonada. En la especie canina, se denomina “complejo entérico canino” a la interacción entre distintos agentes víricos, bacterianos y parasitarios que producen problemas graves de diarrea (Appel, 1988; Edsall, 1989). Los virus aislados con una mayor frecuencia en estos animales son: parvovirus, coronavirus, rotavirus y otros menos frecuentes como calicivirus y virus del moquillo. Existen otros virus infradiagnosticados en la práctica clínica, como son el herpesvirus, el virus de parainfluenza, etc. Por ejemplo, el herpesvirus canino es uno de los agentes más frecuentes en la población canina, pudiendo producir síntomas respiratorios, digestivos y reproductores. Los estudios de prevalencia, a pesar de esto, posicionan al parvovirus, como el agente más frecuentemente aislado en las diarreas en animales menores de 6 meses. Entre las bacterias y parásitos más destacados que intervienen

en este síndrome se encuentran incluidos en los géneros *Campylobacter*, *Escherichia*, *Salmonella* y *Giardia* (England y Poston, 1980; Evermann y col., 1980; Binn y col., 1981; Marshall y col., 1984; Appel, 1988; Edsall, 1989; Evermann y col., 1989)

Se han detectado altas prevalencias de parvovirus y coronavirus en muestras fecales de perros con diarreas procedentes de perreras, lo que indica la influencia de la higiene y de la presión de infección. Además, las diferencias geográficas juegan un papel importante en la prevalencia de los virus entéricos en la enfermedad gastrointestinal canina.

1. Taxonomía y clasificación:

Los parvovirus son virus DNA de cadena simple, sin envuelta, que producen enfermedades desde subclínicas hasta mortales, en una gran variedad de especies. La mayoría de parvovirus son específicos de especie e infectan órganos con células en división rápida, como el intestino, médula ósea y tejido linfoide. La familia Parvoviridae se divide en 2 familias: Parvovirinae y Densoviridae:

1.1 Subfamilia Parvovirinae: infecta vertebrados:

- 1.1.1 Género Amdovirus: afecta a Mustelidos, Mofetas y Mapaches. El prototipo de virus es la enfermedad aleutiana del visón (AMD, Aleutian Mink Disease)
- 1.1.2 Género Aveparvovirus: Afecta a aves. Su principal representante es el Aveparvovirus galliforme 1.
- 1.1.3 Género Bocaparvovirus:
 - 1.1.3.1 Especies: parvovirus bovino (BPV), bocavirus humano (HBoV), virus diminuto de los caninos (CnMV)
- 1.1.4 Género Copiparvovirus:
 - 1.1.4.1 Especies: parvovirus bovino 2 (BPV2), parvovirus porcino 4 (PPV 4)
- 1.1.5 Género Dependoparvovirus: Este género agrupa virus satélite, sólo afecta a células del hospedador coinfectadas con Adenovirus o herpesvirus.

- 1.1.5.1 Especies: Virus adenoasociados 1 (AAV-1), Virus adenoasociados 2 (AAV-2), parvovirus del pato (DBPV)
- 1.1.6 Género Erythroparvovirus:
 - 1.1.6.1 Especies: Parvovirus Humano B19 (B19), parvovirus de los simios (SPV)
- 1.1.7 Género Protoparvovirus:
 - 1.1.7.1 Especies: Virus diminuto del ratón (MVM), Parvovirus Canino (CPV), Parvovirus del raton-1 (MPV-1), Lull virus.
- 1.1.8 Género Tetraparvovirus:
 - 1.1.8.1 Especies: Eidolon helvum parvovirus (Ba-PARV4), parvovirus humano-4 (PARV4G1), parvovirus del chimpancé-4 (ch-PARV4)
- 1.2 **Subfamilia Densovirinae:** infecta invertebrados:
 - 1.2.1 Género Ambidensovirus: parvovirus de lepidopteros.
 - 1.2.2 Género Brevidensovirus: parvovirus de mosquitos.
 - 1.2.3 Género Hepandensovirus: parvovirus de decápodos.
 - 1.2.4 Género Iteradensovirus: parvovirus de la mariposa de seda.
 - 1.2.5 Género Penstyldensovirus: parvovirus de las gambas.

Los Dependovirus son los únicos entre los virus animales que, excepto bajo condiciones especiales, requieren co-infección con un virus colaborador no relacionado, sea un adenovirus o un herpesvirus, para generar una infección productiva (Fields, 2006). Aunque estos virus pueden infectar las células hospedadoras, su genoma sufre una replicación incompleta. Este genoma defectivo puede integrarse dentro del DNA del hospedador y permanecer en un estado latente, activándose posteriormente gracias a la ayuda de un virus colaborador, que inducirá la fase S del ciclo celular y la expresión de los elementos necesarios para la replicación del dependovirus (Chiorini y col., 1996).

Por el contrario, los géneros Parvovirus y Erythrovirus, clasificados como parvovirus autónomos, no necesitan un virus colaborador para la replicación de su genoma, ya que son capaces de replicarse por sí mismos. Sin embargo, al igual que los

dependovirus, requieren que las células del hospedador se encuentren en la fase S del ciclo celular para que se expresen los componentes celulares necesarios para su replicación (Fields, 2006). El hecho de que los parvovirus autónomos solamente repliquen en células en división hace que posean predilección por animales jóvenes, en proceso de gestación, o por tejidos de animales adultos con altos índices de proliferación. Algunos miembros de esta familia tienen un tropismo celular muy reducido, como el parvovirus humano B19, que sólo infecta los precursores eritroides en la médula ósea humana tras el nacimiento.

La infección por parvovirus en gatos se conoce desde hace más de 100 años, producida por el virus de la panleucopenia felina (FPV). En la década de los 40 del siglo pasado se descubrió un virus similar como causante de enteritis en los visones. Aparecieron otras enfermedades causadas por parvovirus en los años 50, como el virus Kilham de las ratas, y el virus H1 (aislado de tejidos en crecimiento). Los virus adenoasociados (AAVs) se identificaron en la década de los 60, aislándose como contaminantes de aislados de adenovirus; estos AAVs mostraron ser dependientes de los adenovirus como ayudantes para su replicación. El parvovirus porcino se identificó en los años 70 como causante de infecciones fetales, y el parvovirus humano B19 se identificó también en los años 70 como causante de eritema infeccioso en niños ("Quinta enfermedad") y anemia en personas con problemas subyacentes de eritropoyesis. En los caninos, se describió el virus por primera vez en 1967 como agente etiológico de enfermedad gastrointestinal y respiratoria, denominándose virus diminuto de los caninos (MVC), designándose más tarde como parvovirus canino tipo 1 (CPV-1). El CPV-2 emergió entre los años 1978-1982.

La lista de parvovirus existentes y sus enfermedades ha continuado creciendo a lo largo de los años debido al descubrimiento de virus en vertebrados así como en invertebrados, incluyendo virus de conejos, caballos, vacas y otras especies. El análisis de DNA de secuencias de virus desconocidos ha producido una identificación de un número elevado de parvovirus en humanos y otros animales. Estos virus humanos

parecen no están directamente asociados con ninguna enfermedad, aunque los últimos bocavirus descritos parecen estar asociados con enfermedad respiratoria en neonatos infectados con otros agentes. Parece que existen parvovirus en muchos animales, pero sólo unos pocos son causantes de enfermedad o infecciones subclínicas.

2. Morfología vírica:

2.1. Cápside vírica:

2.1.1. Estructura:

A pesar de su pequeño tamaño, el genoma de los parvovirus puede generar varias proteínas con múltiples funciones que garantizan un ciclo vírico altamente efectivo. El gen que codifica para la cápside vírico (VP) es traducido en las proteínas VP1 y VP2; VP2 sufre, a su vez, proteólisis tras la traducción, dando lugar a la variante VP3.

El CPV-2 carece de envoltura lipídica y posee una cápside de 26 nm de diámetro, formada por 60 subunidades compuestas por VP1, VP2 y VP3, las cuales se ensamblan en un icosaedro con un número de triangulación $T=1$ (Hueffer y Parrish, 2003; Fields, 2006).

Por cristalografía de rayos X se ha determinado que la cápside está formada por un total de 60 copias de VP1 y VP2 combinadas (y VP3 en los virus que la poseen) (Decaro, N. y Buonavoglia C., 2012). VP1 contiene la secuencia completa de VP2 y un dominio N-terminal. Este extremo N-terminal de VP1 se encuentra enterrado en la cápside cuando el virus se encuentra dentro de la célula, siendo expuesto al exterior en el proceso de infección por mecanismos desconocidos. VP2 es la proteína estructural más abundante, representando un 90% de la cápside vírico, siendo el mayor determinante del rango de hospedador y de la interacción entre virus y

hospedadores. VP2 se escinde en VP3 por proteasas del hospedador (Decaro, N. y Buonavoglia C., 2012).

Mediante estos análisis de cristalografía por rayos X se ha determinado también que la superficie de la cápside tiene un cilindro hueco en cada eje de simetría pentaxial, rodeado por una depresión circular llamada cañón; también posee una protrusión en cada eje de simetría triaxial, llamada espina o punta, y una depresión en cada eje de simetría biaxial, llamada hoyuelo (Figura 1). En las protrusiones del eje de simetría triaxial se han mapeado regiones antigénicas, y dentro de la depresión del eje 2 sitios relacionados con la unión al receptor celular (Fields, 2006). Por ejemplo, las diferencias en el rango de hospedador entre el CPV y FPV se encuentran en la variación de 2 aminoácidos en la espina.

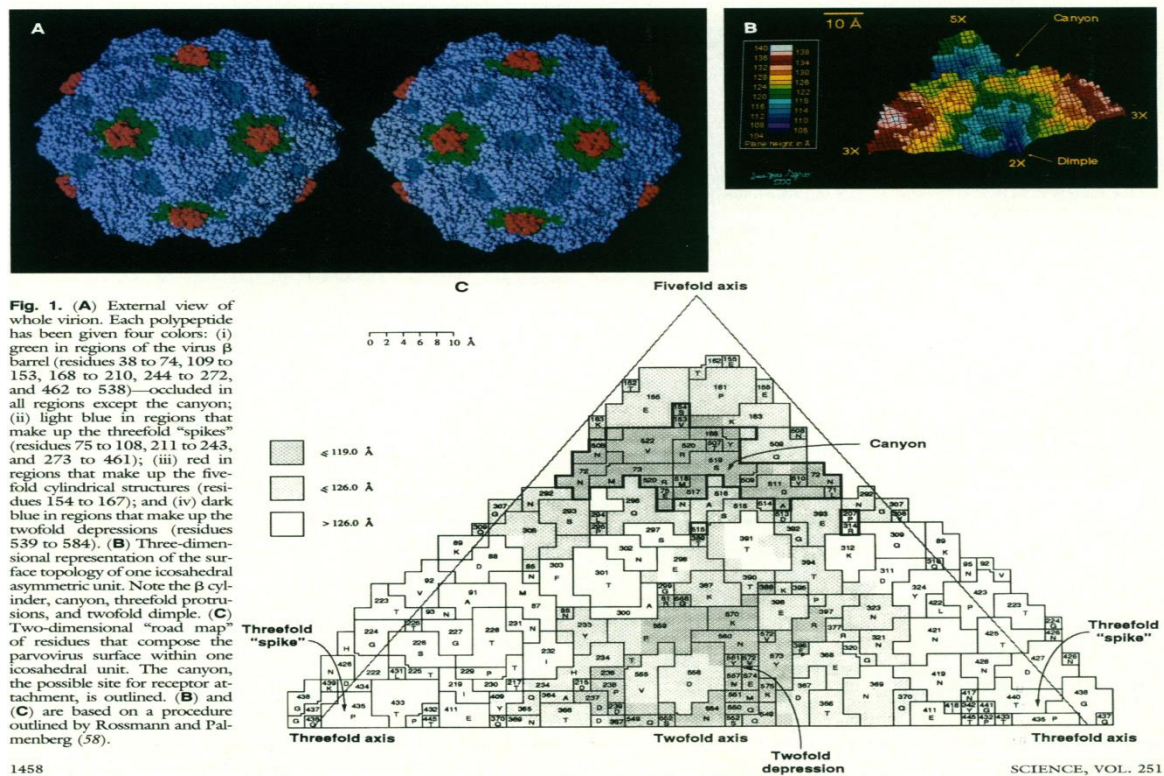


figura 1: estructura tridimensional del parvovirus (Extraído de Tsao y col, 1991)

La cápside contiene una actividad enzimática fosfolipasa A2 así como secuencias de bases que controlan el transporte nuclear de las proteínas de la cápside durante la infección y replicación. La actividad enzimática de la fosfolipasa A2 varía significativamente dependiendo del virus examinado, pero parece ser necesaria para la

infección celular, modificando la membrana endosomal para permitir el ingreso del virus al citoplasma.

La cápside puede unirse a una gran variedad de receptores celulares para provocar infección. Ejemplos de estos receptores y proteínas co-receptoras son el receptor de crecimiento de los fibroblastos (AAV tipo 2), el receptor de la transferrina (CPV y FPV), etc.

2.1.2. Proteínas de la cápside:

La principal proteína de la cápside se denomina VP2 (o VP3, dependiendo del virus), ya que contiene los determinantes antigénicos principales y juega un papel muy importante en la patogenicidad del virus. (Muzyczka and Berns, 2001). VP2 es necesaria para ensamblar la cápside y empaquetar el genoma vírico en su interior. Esta proteína también le permite al virus ingresar a la célula a través de su interacción con el receptor celular de la transferrina (TfR). Por esta razón, unos pocos cambios en la secuencia de aminoácidos de la VP2 pueden variar el grado de afinidad con su receptor celular, lo que podría alterar la capacidad infectiva y el rango de hospedadores del virus. Se ha relacionado también VP2 con la interacción con ácido siálico (SA); asimismo, juega un papel importante en el proceso de infección celular ya que posee actividad fosfolipasa A2. Sus sitios antigénicos son el principal blanco de los anticuerpos del hospedador, los cuales protegen contra la infección (Parrish & Kawaoka, 2005). Además, tiene capacidad de autoensamblaje, formando partículas inmunocompetentes similares a virus (López de Turiso y col., 1992).

La proteína VP2 posee una estructura común en forma de barril β , compuesto por ocho láminas β antiparalelas, conectadas a través de α hélices que forman lazos (Tsao y col., 1991; Agbandje y col., 1995). La superficie de la cápside vírico está formada principalmente por estos lazos, que determinan propiedades biológicas tales como el rango de hospedador, el tropismo celular, la unión al receptor celular, así como propiedades antigénicas. Las inserciones entre las cadenas β D y β E del barril β forman una cinta β antiparalela, la cual junto a inserciones similares en otros cuatro polipéptidos cercanos forman un cilindro en el eje de simetría 5 de la cápside vírico; en

este cilindro hay una abertura a la superficie de la partícula vírica por la que VP2 es externalizada para su escisión en VP3 en las partículas maduras.

La proteína VP1 forma también parte de la cápside vírico. Presenta unas secuencias básicas que podrían estar controlando los procesos de transporte nuclear (Parrish & Kawaoka, 2005). VP1 es esencial para la infectividad del virus, por lo que se cree que el dominio N-terminal adicional de la misma posee una función específica (Spitzer y col., 1997). Por otro lado, existe evidencia de que dicho extremo se localiza internamente y que ayudaría a neutralizar el DNA vírico (Tsao y col., 1991).

La proteína VP3 es el componente minoritario de la cápside y resulta de una escisión proteolítica post-traducciona de 15 a 20 aminoácidos del extremo N-terminal de VP2, expuesto hacia el exterior de la cápside. Dicha escisión se realiza tras el ensamblaje de las partículas víricas que contienen el genoma vírico (partículas completas) (Tsao y col., 1991). En las partículas víricas carentes de genoma no se ha constatado la presencia de la proteína VP3 (Agbandje y col., 1995).

La proteína NS1 es el producto de mayor tamaño del gen NS, posee una localización nuclear y está involucrada en el control de la replicación del DNA ya que reconoce, une y corta el DNA vírico durante la replicación (Cotmore et Tattersall, 2003). A su vez, posee actividad helicasa y ATPasa, regula la expresión génica, controla el empaquetamiento del DNA dentro de la cápside (Daeffler y col., 2003), interviene en el control de la apoptosis celular después de la infección vírica, y es la responsable del reconocimiento y unión a varias proteínas celulares (Nuesch y col., 1998; Fields, 2006). Por último, la proteína NS2 se encuentra en el núcleo y en el citoplasma, y a pesar de ser aún poco conocida, se cree posee un papel de una manera dependiente del tipo celular y del hospedador, en el ensamblaje correcto de la cápside y en el tráfico de los componentes de la misma (Cater & Pintel, 1992; Miller & Pintel, 2002). Además, se presupone que interviene en el proceso de regulación de la expresión génica, pero no parece tener un papel mayor en el ciclo vírico (Wang y col., 1998; Fields, 2006).

2.2. El genoma vírico:

Los parvovirus que afectan a los vertebrados, a pesar de las diferencias en las secuencias de muchos de ellos, comparten secuencias en una región de las proteínas no estructurales, lo que sugiere que todos los virus tienen un ancestro común y propiedades comunes. El genoma de todos ellos oscila entre 4500 y 5200 bases de longitud, contienen 2 marcos de lectura abiertos (ORF), así como secuencias terminales palindrómicas implicadas en el control de la replicación del DNA. El marco de lectura abierto izquierdo codifica las proteínas no estructurales, y el derecho las estructurales. El genoma puede contener entre uno y 3 promotores funcionales para la transcripción del RNA.

El genoma de CPV-2 está constituido por una cadena de DNA de aproximadamente 5,2 Kb y de polaridad negativa que, por convención, se representa en dirección 3'-5' (Berns, 1990).

El DNA vírico, al igual que el resto de parvovirus, posee dos unidades transcripcionales (Reed y col., 1988). (Figura 2). El transcripto de la primera unidad produce los RNA mensajeros de las proteínas no estructurales (NS1 y NS2) por un mecanismo que implica un corte y empalme alternativo en el mensajero de la NS2 (Hoelzer y col., 2008). Este mecanismo genera un cambio en el marco de lectura a partir del sitio de eliminación del intrón, por lo que las proteínas NS1 y NS2 son idénticas en su extremo N-terminal pero difieren en el extremo C-terminal.

El transcripto generado por la segunda unidad produce los RNA mensajeros de las proteínas estructurales (VP1 y VP2), también por procesamiento diferencial (Reed y col., 1988). La secuencia completa de VP2 está presente en VP1, que contiene un dominio N-terminal adicional de 143 aminoácidos (Hoelzer y col., 2008).

Al igual que todos los parvovirus autónomos, CPV-2 posee secuencias palindrómicas en ambos extremos de su genoma. Estos palíndromos son diferentes en cada extremo y se pliegan sobre sí mismos para actuar como cebadores durante la replicación (Berns, 1990).

Una característica del genoma del parvovirus canino es la presencia de unidades de repetidos directos ubicados hacia el extremo 5' del genoma vírico

(extremo derecho). Según la cepa de referencia de CPV-2 (número de acceso M19296 en la base de datos GenBank) existen dos grupos de repetidos en dicha región vírico (Reed y col., 1988). El primer grupo de repetidos está compuesto por dos monómeros: uno que flanquea el codón stop del gen VP1/VP2 y tiene 61 nucleótidos, y otro posterior que posee 62 nucleótidos y presenta una inserción de una A entre la posición 15 y 19, y una transición C→T en la posición 29. El segundo grupo de repetidos está compuesto por tres monómeros de 62 nucleótidos cada uno. Los dos primeros presentan secuencias idénticas (representadas en dirección 5'-3'), mientras que el tercer monómero presenta una transversión G→T en la novena base del repetido (Reed y col., 1988). Estos repetidos también están presentes en otros virus de la subfamilia Parvovirinae como el FPV, MEV y RPV.

2.3. Ciclo replicativo:

Aunque todos los parvovirus parecen entrar e infectar células a través de procesos endocíticos mediados por receptor, las vías específicas no han sido totalmente definidas, ya que muchos virus son capaces de utilizar múltiples rutas endosomales de infección. Parece ser que el virus ingresa en la célula del hospedador a través de su interacción con el receptor celular de la transferrina (TfR). El TfR es una proteína transmembrana presente en todas las células del organismo, a excepción de los eritrocitos maduros, y es responsable de la unión y transporte del hierro circulante hacia el interior de las células (Skikne, 1998). Aunque el virus también posee la capacidad de unirse a ácido siálico en la superficie de algunas células, esta propiedad no parece ser importante para la infección vírico, ya que viriones mutantes para dicha capacidad continúan siendo infectivos (Barbis y col., 1992). La internalización del virus en la célula del hospedador se produce mediante un proceso que implica vesículas de endocitosis recubiertas de clatrina (Figura 2).

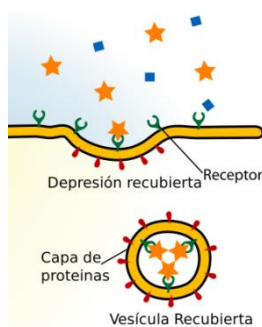


figura 2: internalización del virus mediante procesos de endocitosis

En una etapa posterior del proceso, el virus puede ser encontrado en lisosomas, donde se requiere un pH bajo para la infección o para el tráfico posterior del virión (Vihinen-Ranta y col., 2004). A continuación, ocurre la penetración del virus al citosol; este es un proceso lento y no se conoce totalmente, aunque parece controlado por la actividad de la fosfolipasa A2 de VP1, estando implicada la lisis de las vesículas endosomales. Una vez en el citoplasma, la cápside puede asociarse con motores moleculares basados en microtúbulos, como la dyneina y la kinesina, y localizarse en la región pericentriolar de la célula, cerca del centro organizador de los microtúbulos.

No se sabe exactamente cómo el DNA vírico entra al núcleo celular, hay 2 teorías: la primera es que, las pequeñas partículas víricas pasen a través de los poros del núcleo, intactas. Otra teoría es que la cápside vírica afecte directamente a la envoltura nuclear, permitiendo que entre el virus al núcleo por replicación. En cualquiera de los casos, la cápside y el DNA entran al núcleo de la célula hospedadora. Parece que el DNA se extrae de la cápside debido a la actividad de la DNA polimerasa del hospedador, que inicia la replicación en el extremo 3' del DNA.

La modificación de las proteínas de la cápside por el proteosoma celular expone secuencias de localización nuclear (NLSs). Estas secuencias son necesarias para el ingreso del virión al núcleo, por lo cual este último proceso es un fenómeno específico, y activo ya que implica la utilización de ATP y factores citosólicos solubles (Vihinen-Ranta y col., 2004).

El modelo consenso para la replicación del DNA de los parvovirus se propuso a partir de los trabajos en Virus diminuto de ratón, (MVM), un miembro prototipo de los parvovirus autónomos. Sin embargo, aún existen pasos importantes que no están apoyados por una evidencia experimental, por lo tanto, el modelo debe ser considerado como un ejemplo de cómo los parvovirus autónomos pueden duplicar su genoma generando intermediarios replicativos (Fields, 2006). Debido a que todas las DNA polimerasas conocidas requieren un cebador con un 3'OH libre para comenzar con la síntesis, y ésta ocurre en sentido 5'-3', los genomas DNA han tenido que desarrollar distintas estrategias para mantener su extremo 5' intacto. Como se ha descrito, los genomas de los parvovirus han desarrollado secuencias palindrómicas terminales que resultan indispensables para una replicación exitosa (figura 3).

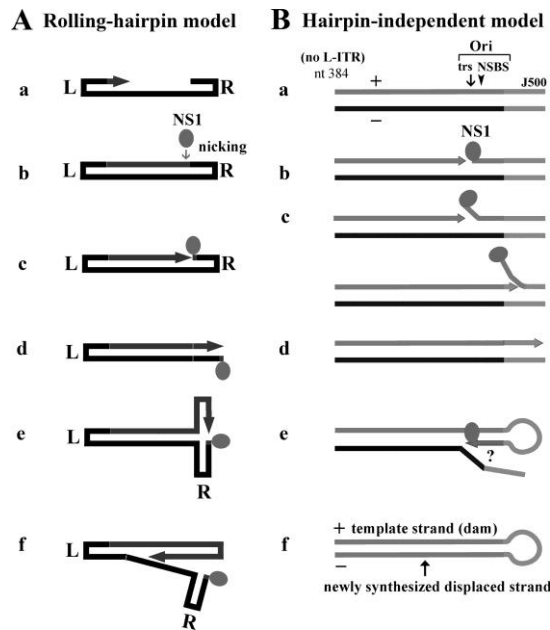


figura 3: replicación de los parvovirus (Guan y col., 2009)

Se asume que el extremo 3' (izquierdo) se pliega sobre sí mismo como una horquilla para servir como cebador en la iniciación de la síntesis de la hebra complementaria (Berns, 1990). La síntesis del DNA complementario genera un intermediario replicativo doble hebra (dsRF). Cuando la síntesis alcanza el extremo 5' (derecho), que también se ha plegado sobre sí mismo, se cree que ocurre una unión entre la hebra complementaria recientemente sintetizada y la hebra parental, resultando en una molécula doble hebra covalentemente cerrada en ambos extremos (cRF). Tras esto, la proteína vírico NS1 corta la hebra complementaria a unos 18-26 PBs del extremo 5' parental plegado, y se produce una unión covalente entre dicha proteína y el extremo 5' libre generado (Fields, 2006). Este hecho origina un extremo 3'OH que es usado para reparar el extremo derecho generando una forma dúplex extendida del mismo. Luego, el extremo derecho extendido forma un intermediario doblemente plegado (configuración denominada orejas de conejo) que provee un nuevo 3'OH libre para la reiniciación de la síntesis por desplazamiento de la hebra genómica. Esto conduce a la formación de concatémeros (dímeros de dsRF), que da lugar a un dsRF con el extremo izquierdo covalentemente cerrado, y a otro con ambos extremos abiertos. A continuación, este último provee la hebra negativa del virus a ser

encapsidada, mientras que la hebra positiva vuelve a sufrir replicación. A su vez, el dsRF con el extremo izquierdo covalentemente cerrado vuelve a entrar en el proceso de replicación.

Cuando el genoma vírico es encapsidado, las 18-26 bases 5' terminales adicionales observadas en los intermediarios replicativos se extienden hacia el exterior de la cápside para ser posteriormente eliminadas (Berns, 1990).

Debido a que una o ambas proteínas NS son proteínas reguladoras, su síntesis parece ocurrir antes que la de las proteínas estructurales. Una vez sintetizadas, estas proteínas migran al núcleo para actuar en la regulación de la expresión génica vírico, en la replicación del genoma vírico y el empaquetamiento de los nuevos viriones. Al igual que éstas, las proteínas estructurales, una vez traducidas en el citoplasma, deben migrar al núcleo para participar en el ensamblaje de las nuevas partículas víricas (Berns, 1990). Los viriones emergen de la célula lisándola, produciendo un efecto citopático en las células infectadas.

Además de la proteína vírica NS1, son necesarias otras proteínas celulares auxiliares, así como las DNA polimerasas celulares para el ciclo replicativo de los parvovirus. Existen ensayos de inhibición indican que la DNA polimerasa α así como la DNA polimerasa γ estarían involucradas en la replicación del genoma parvovírico pero aún no se ha podido determinar si la DNA polimerasa δ también estaría implicada (Berns, 1990).

3. El parvovirus canino:

3.1. Origen del parvovirus canino:

Todos los virus de esta familia parecen proceder de un ancestro común y los análisis filogenéticos muestran que los virus pueden dividirse en grupos relacionados o clados. La evolución de los virus no está clara ya que la variación de las secuencias en el tiempo durante largos periodos es desconocida. Cuando se analizan secuencias de CPV y B19 con datos conocidos, la tasa de evolución es muy alta, entre 10^{-4} – 10^{-5} sustituciones por nucleótido por año, casi similar a las tasas observadas en los virus

RNA. Se han detectado variaciones intrahospedador durante infecciones persistentes por MVM en ratones inmunodeficientes y por B19 en humanos. El DNA vírico se replica por la DNA polimerasa del hospedador, y, aunque la fidelidad de la replicación es desconocida, parece menor que cuando se produce la replicación del DNA del propio hospedador (Parrish, C., 2008).

A lo largo del tiempo, la evolución del CPV 1 y FPV ha permanecido estable, lo que contrasta con CPV 2, que ha evolucionado rápidamente desde que se descubrió hace más de 30 años (Parrish, C., 2008).

El CPV-2 fue detectado por primera vez en 1978 en Estados Unidos, y casi simultáneamente en Australia y Europa (Appel y col., 1978). Fue nombrado de esta forma para diferenciarlo del CPV-1 (Parvovirus canino tipo 1) previamente descrito con el que, a pesar de compartir un cuadro clínico similar, no se encuentra evolutivamente relacionado (Truyen, 2000). Pese a su primer reporte a fines de la década del 70, estudios serológicos posteriores indicaron que el CPV-2 estaba presente en Europa en 1976 (Schwers y col., 1979). Koptopoulos y col. (1986) ya describió anticuerpos neutralizantes de CPV-2 en sueros de perros de Grecia de 1974. Sin embargo, los autores remarcan que sus estudios podrían haber detectado otros parvovirus relacionados, o quizá el ancestro de CPV-2. Por otro lado, Shackelton y col. (2004) estimaron la tasa de evolución molecular del parvovirus canino y sugirieron que el CPV-2 ancestral emergió en la población canina en 1968.

CPV emergió, como ya se ha dicho, a finales de los años 70 del siglo pasado, como una variante del FPV, parece que por una adaptación de un parvovirus intermediario en carnívoros salvajes. No hay una evidencia definitiva de esta teoría, pero la hipótesis se basa en la circulación activa de virus intermediarios entre FPV y CPV en carnívoros salvajes y por la supuesta incapacidad de FPV de infectar a perros (Truyen, 2006). La cepa vírica original, a la que se llamó CPV 2 para distinguirla de la ya conocida CPV-1, causó gastroenteritis hemorrágicas fatales y miocarditis subagudas en perreras y criaderos por todo el mundo (Truyen, 2006). La secuencia de DNA del CPV tiene un 99 % de similitud con la secuencia de FPV, aunque las propiedades de ambos virus son diferentes, incluyendo el rango de hospedadores tanto in vivo como in vitro (Hueffer et Parrish, 2003). Ambos virus crecen en cultivos celulares felinos, pero sólo

CPV se replica eficientemente en perros y en cultivos celulares caninos (Truyen et Parrish, 1992; Hueffer et Parrish, 2003). La infección in vivo presenta también varias diferencias: mientras que FPV infecta las células del timo de los perros tras su inoculación oral, las primeras cepas de CPV 2 no se replicaban eficientemente en gatos (Truyen et Parrish, 1992; Hueffer et Parrish, 2003). Las diferencias entre el rango de hospedadores se producen por cambios en distintos residuos en 3 regiones de la cápside, situadas en el eje de simetría triaxial. Las estructuras alrededor de los residuos 93, 300 y 323 de VP2 están implicadas en controlar la infección en canidos (Chang y col., 1992; Horiuchi y col., 1994; Strassheim y col., 1994; Llamas-Saiz y col., 1996; Parker et Parrish, 1997; Hueffer et Parrish, 2003). Estos cambios se encuentran en el dominio de VP2 que interactúa con el receptor de la transferrina de la célula hospedadora (TfR), por lo que una diferencia en la unión de las cápsides de CPV y FPV con el receptor de la transferrina controla el rango de hospedadores. Este receptor se expresa con una alta densidad en células en división activa, lo que explica la patogenia de la infección por parvovirus y la necesidad del virus de tejidos activos mitóticamente (Parrish, 1995; Hueffer y col., 2003; Truyen, 2006). Las sustituciones en los residuos 93 y 323 en FPV permiten al virus unirse al receptor canino de la transferrina e infectar células caninas (Parker y col 2001; Hueffer y col., 2003; Hueffer et Parrish, 2003). La región alrededor del residuo 300 está además implicada en controlar la infección in vivo en felinos por CPV (Truyen y col, 1994; Hueffer et Parrish, 2003). Otra gran e importante diferencia entre ambos virus es que CPV ha evolucionado mucho más rápidamente que FPV, mostrando unas tasas de sustitución genética similares a los virus RNA (Decaro, N y Buonavoglia C., 2012), aproximadamente unos 10^{-4} sustituciones por sitio por año.

3.2. Evolución del CPV-2:

La circulación activa del virus del nuevo virus CPV-2 y los programas iniciales de vacunación proporcionaron inmunidad en las poblaciones caninas, reduciendo la mortalidad y la diseminación del virus. Sin embargo, la presión inmunitaria de los hospedadores pudo contribuir a la emergencia progresiva de las variedades antigénicas del CPV-2. En 1979 y 1980, se detectó la presencia de una nueva variante

antigénica de CPV-2 en varios países mediante ensayos con anticuerpos monoclonales, análisis con enzimas de restricción, y secuenciación. Dicha variante fue denominada CPV-2a, y se diferencia de la variante original (CPV-2) por seis cambios aminoacídicos (Met-87-Leu, Ile-101-Thr, Val-103-Ala, Ala-300-Gly, Asp-305-Tyr, Val-555-Ile) en la secuencia proteica de VP2 (Martella y col., 2006). La nueva cepa CPV-2a se extendió por todo Estados Unidos en 1979, y reemplazó a la cepa original en los años 1980 y 81 (Parris y col., 1991; Pereira y col., 2000).

En 1984 una segunda variante antigénica llamada CPV-2b, fue caracterizada por la pérdida de un epítipo neutralizante reconocido por anticuerpos monoclonales (MAbs) utilizados en las tipificaciones. Dicha variante difiere de CPV-2a en dos aminoácidos (Asn-426-Asp y Ile-555-Val) de la cadena proteica de VP2 (Parrish y col., 1988, 1991; Costa y col., 2005). El cambio en la posición 426 es el responsable de la pérdida del epítipo neutralizante ya que dicho aminoácido se encuentra expuesto en el sitio antigénico mayor (epítipo A), localizado en el eje de simetría triple de la cápside icosaédrica vírico (Nakamura y col., 2004; Decaro y Buonavoglia, 2012). Las antiguas variantes de CPV-2a tenían una isoleucina en el residuo 555, que las diferenciaba de las variantes CPV-2 y 2b; las nuevas variantes de CPV-2a poseen una valina en dicho residuo, al igual que las otras variantes, por lo que sólo se distinguen de CPV-2b y 2c en la posición 426 de la proteína VP2 (Martella y col., 2006; Decaro y col., 2009; Decaro y Buonavoglia, 2012).

En poco tiempo, CPV-2a y CPV-2b fueron reemplazando por completo al CPV-2 original a nivel mundial, produciéndose el mismo patrón de diseminación y de remplazo de las nuevas variantes antigénicas en Dinamarca, Alemania, Francia, España, Japón, Australia y África, aunque la proporción entre CPV-2a y 2b era distinta (Parrish y col., 1988, 1991; Mochizuki y col., 1993; Ibáñez y col., 1995; Truyen y col., 1996; Steinel y col., 1998, Pereira y col., 2000). Además, las variantes antigénicas extendieron su rango de hospedador ya que al contrario de la variante original, eran capaces de infectar perros y gatos domésticos (Truyen y col., 1996), así como carnívoros salvajes, tales como el tigre siberiano, el zorro orejas de murciélago, y el guepardo (Steinel y col., 2000). El rango de hospedador felino de las nuevas variantes antigénicas CPV-2a y CPV-2b está probablemente determinado por los cambios aminoacídicos en las

posiciones 87, 300 y 305 (Steinel y col., 2000). Actualmente, las variedades antigénicas han remplazado completamente el virus original, que es todavía utilizado en la mayoría de vacunas.

Se han producido otras mutaciones en las últimas décadas como por ejemplo S297A y T440A. El residuo 297 se encuentra en el epítipo B y las sustituciones en esta zona son responsables de cambios en la antigenicidad de las distintas variantes de CPV (Truyen, 2006).

3.3. Dinámica de emergencia:

Hasta los últimos años, las infecciones por parvovirus se habían convertido en infecciones relativamente tratables y prevenibles. Las tasas altas de mortalidad solían estar relacionadas en las perreras o los refugios con cachorros, animales no vacunados o estresados. Actualmente, el parvovirus ha comenzado a producir problemas en animales bien manejados y bien vacunados, sobre todo en criaderos. Además, los animales adultos vacunados están desarrollando cuadros de diarrea relacionados con parvovirus.

En estudios recientes se ha demostrado que el virus se encuentra en un activo proceso de evolución. En los últimos años, la mayoría de las cepas de CPV-2a y CPV-2b que se han aislado presentan la sustitución Ser-297-Ala en la proteína VP2, por lo cual han sido clasificadas como CPV-2a y CPV-2b nuevas (Truyen, 1999; Ikeda y col., 2000; Buonavoglia y col., 2001; Battilani y col., 2001; Battilani y col., 2002; Chinchkar y col., 2006). Asimismo, estas nuevas variantes presentan Val en la posición 555 al igual que el FPLV y el CPV-2 original.

La caracterización de las cepas circulantes en una determinada región es de gran importancia para entender su epidemiología y virulencia, así como el impacto de la vacunación y las estrategias de contención de la enfermedad. Asimismo, la tipificación de las variantes presentes, así como el análisis de los cambios existentes entre ellas es imprescindible para el estudio de la evolución del virus. Los virus DNA usualmente poseen una tasa de evolución relativamente baja, sin embargo el CPV-2 presenta una tasa de cambio muy elevada, más parecida a la de los virus RNA (Shackelton y col., 2005). Esto puede explicar la rápida y constante evolución de CPV-2

observada durante su corta historia desde su primera descripción en 1978. Los estudios evolutivos indican claramente que el CPV-2 cambia por la adquisición de mutaciones puntuales, particularmente en los genes de las proteínas de cápside. Éste constituye el mecanismo típico de variación del CPV-2 hasta ahora estudiado.

3.4. CPV-2c:

En el año 2000 se detectó un nuevo tipo antigénico de CPV en Italia (Buonavoglia y col. 2001). Se tomaron 2 muestras fecales de 2 perros con enteritis hemorrágica, positivos a CPV por hemoaglutinación y ambas muestras se caracterizaron como CPV-2b en base a su reactividad con anticuerpos monoclonales (MAbs) y los resultados de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Al realizar la secuenciación de un fragmento de VP2 se encontraron 2 variaciones de aminoácidos en ambas muestras: S297A y D426E. Mientras que la sustitución en el residuo 297 se ha encontrado en muchas de las cepas CPV-2a y 2b que circulan actualmente, la sustitución en el residuo 426 no se había observado previamente, y además está situada en el epítipo A. Estas cepas se denominaron inicialmente mutante glu-426, detectándose por toda Italia (Decaro y col., 2006, 2007) y parece ser que distribuidas por gran parte del mundo (Nakamura y col., 2004; Decaro y col., 2006, 2007, 2011; Hong y col., 2007; Kapil y col., 2007; Pérez y col., 2007; Vieira y col., 2008; Touihri y col., 2009; Nandi y col., 2010; Ntafis y col., 2010; Filipov y col., 2011).

Debido a su amplia distribución, este mutante fue propuesto como una nueva variante de parvovirus, el CPV-2c (Decaro y col., 2006). Sin embargo, esta designación ya había sido propuesta por Ikeda y col. en el año 2000, asignada a cepas detectadas en felinos domésticos y salvajes en Asia. Estas cepas mutantes presentaban una nueva sustitución independientemente del tipo antigénico 2a o 2b, por lo que se designaron CPV-2a(c) o CPV-2b(c) en función del residuo que apareciera en la posición 426 (Asn o Asp) de la proteína VP2. Estas cepas presentaban además una mutación en el residuo 300, asociada a la adaptación de CPV a los hospedadores felinos (Ikeda y col., 2000). Estos cambios sólo se han encontrado posteriormente en un estudio en Corea en un perro (Kang et al., 2008), estando ausentes en los distintos estudios realizados por todo el mundo (Meers y col., 2007; Ohshima y col., 2008; Decaro y col., 2009), por lo que se

supone que estos mutantes están restringidos a la zona del sudeste asiático. El mutante glu-426 está ampliamente distribuido por toda Italia, y se ha demostrado su presencia en distintas partes del mundo, por lo que finalmente se adoptó la terminología de CPV-2c para esta variante, considerándose que el mutante CPV Asp-300 es una mutación dentro de las cepas CPV-2a y 2b (Decaro et al, 2009).

A pesar de haber sido detectada en varios países del mundo, poco se sabe respecto a las propiedades biológicas de la variante CPV-2c ya que ha sido escasamente estudiada en profundidad. Parece que puede ser altamente virulenta, con alta morbilidad y muerte rápida, aunque como ya hemos indicado, no existen muchos estudios al respecto.

3.5. Distribución de las variantes antigénicas a nivel mundial:

Existen numerosos estudios en distintos países que pretenden determinar cuál es la cepa circulante más frecuente en cada zona. Decaro y col (2001) describieron por primera vez una nueva mutación en el epítipo A en el año 2000, el mutante Glu-426, más tarde conocido como CPV-2c. Hasta entonces, las cepas predominantes eran CPV-2a y CPV-2b, coexistiendo en muchas zonas. Los análisis retrospectivos realizados han revelado que no existía CPV-2c anterior al año 2000 en Italia. Actualmente, los estudios realizados por Decaro y col (2011), parecen indicar que esta nueva variante antigénica ha sustituido a CPV-2b, que era la predominante con anterioridad en este país. Se han realizado varios estudios en distintos países encaminados a determinar la variante antigénica predominante: se ha detectado el CPV-2c en Portugal (Vieira y col., 2008) coexistiendo con CPV-2b; en EEUU (Capil et al., 2007; Hong y col., 2007) se ha detectado la cepa CPV-2c, aunque la predominante en los últimos estudios era CPV-2b; en Brasil, los estudios presentados hasta el momento no han detectado CPV-2c, siendo la cepa predominante CPV-2a (Pereira y col., 2000; Costa y col., 2005; Pereira y col., 2008); en Uruguay, la cepa CPV-2c ha sustituido totalmente al resto de cepas circulantes hasta el momento (Pérez y col., 2007), aunque los últimos estudios indican que existe una nueva cepa CPV-2a similar a las circulantes en China, de la que se desconoce aún su patogenicidad (Pérez y col., 2012); En Argentina, se ha detectado CPV-2c en muestras desde el año 2007 (Gallo y col., 2009, 2011), coexistiendo con las

variantes 2a y 2b; en Grecia (Ntafis y col., 2010), parece que la cepa predominante es la CPV-2a, existiendo algún caso esporádico de 2b y 2c; en Túnez, en un estudio realizado entre junio 2007 y septiembre 2008, la cepa predominante es la CPV2b, coexistiendo con 2a y 2c en la misma proporción (Touihri y col., 2008); en Bulgaria, la cepa predominante es CPV-2a, encontrándose tan sólo un caso en un estudio de CPV-2c (Filipov y col., 2011); en Alemania, en un estudio retrospectivo, se detectaron muestras de CPV-2c desde 1996, aunque la cepa predominante es CPV-2b (Decaro y col., 2007); en este último estudio, se analizó una muestra perteneciente a Suiza y otra a República Checa, siendo las 2 muestras CPV-2a, aunque el estudio en este caso no es significativo; en Reino Unido coexisten 2a y 2b (Davies, 2008; Clegg y col., 2012), detectándose sólo un caso de CPV-2c en una muestra en un estudio preliminar (Decaro y col., 2007).

En cuanto a la península ibérica, existe un estudio en Portugal (Vieira y col., 2008) donde, a pesar de que el tipo antigénico predominante es CPV-2b, se detecta en gran cantidad CPV-2c. En nuestro país, existe tan sólo un estudio realizado en 2006 en un criadero de basset hounds en Tarragona (Decaro y col., 2006), en el que se estudia una camada de animales de 40 días con diarrea hemorrágica, vómitos y muerte a los 3-5 días del comienzo de la sintomatología. Estos animales se encontraban sin vacunar. Se tomó sólo una muestra de uno de los animales, siendo éste positivo por hemoaglutinación (HA) y PCR a tiempo real a CPV. Se realizó también la secuenciación de la muestra, así como la búsqueda de otros patógenos concomitantes como coronavirus canino (Decaro y col., 2006). En este estudio concluyeron que, la muestra procesada pertenecía a la cepa CPV-2c, detectando además co-infección con Coronavirus canino tipo I y II.

3.6. Rango de hospedadores:

En los cultivos in vitro, FPV se replica eficientemente sólo en líneas celulares felinas, mientras que CPV puede infectar tanto líneas celulares caninas como felinas. In vivo, FPV se replica en los perros en el timo y médula ósea y no se excreta en heces. La cepa original de CPV no se replicaba en gatos. Sin embargo, ambas cepas 2a y 2b sí que tienen la habilidad de replicarse en hospedadores felinos (Truyen, 2006). Los estudios

existentes de interacciones de FPV y CPV con sus receptores celulares (el receptor de la transferrina, TfR), concluyen que FPV se une específicamente al TfR felino, mientras que CPV-2 y sus variantes antigénicas se unen tanto al TfR canino como felino (Palermo y col., 2006).

Existen casos de panleucopenia felina producidas por CVP 2a y 2b en la bibliografía, tanto en felinos domésticos como salvajes (Truyen, 2006). Con respecto a la cepa 2c, se han detectado 3 gatos con panleucopenia CPV-2c positivos en Italia (Battilani y col., 2006; Decaro y col., 2010, 2011), produciéndose un cuadro leve de enfermedad en 2 de ellos, y un cuadro neurológico grave en otro no asociado a CPV, debido a un absceso intracraneal.

3.7. Potencial patógeno de las distintas cepas de parvovirus:

Una consecuencia biológica de la acumulación de cambios en los aminoácidos de VP2 es el aumento de la patogenicidad de las variantes de CPV-2 (Carmichael, 2005; Decaro et Buonavoglia, 2012). En comparación con la cepa original, las variantes antigénicas 2a y 2 se excretan en heces en títulos mucho más altos y producen infecciones más severas. Además, producen infección con una dosis mucho más baja de virus. En infecciones experimentales en perros con diferentes niveles de anticuerpos maternos, CVP-2b se elimina en altos títulos en las heces de los animales infectados (Decaro y col., 2005; Decaro et Buonavoglia, 2012).

El potencial patógeno de CPV-2c se encuentra en controversia y discusión aún. Los primeros estudios realizados en 2005 (Decaro y col, 2005) parecían indicar que esta cepa tenía menor potencial patógeno que 2a y 2b. En este estudio se incluyeron 2 camadas de cachorros de pastor alemán, infectados naturalmente. Todos los cachorros presentaron diarrea mucosa, leucopenia y recuperación rápida en pocos días. En estos animales se detectó la excreción en heces de CPV-2c hasta 51 días postinfección. Sin embargo, otros estudios (Spibey y col., 2008), la infección por CPV-2c parece inducir una enfermedad más severa que otras variedades; en este estudio se realizó una infección experimental en 6 beagles con una cepa de campo de CPV-2c. Todos los animales sufrieron diarreas hemorrágicas y leucopenias severas, sobreviviendo sólo 3 tras terapia de soporte intensiva. Realmente, hasta la fecha, no se ha establecido

claramente si unas cepas son más virulentas que otras, y los datos de los que se dispone están basados en observaciones de campo o en infecciones experimentales. Lo más razonable es pensar que todas las variantes tienen un potencial patógeno similar, que puede aumentar o disminuir según las condiciones particulares (edad, estado inmunológico, factores estresantes, infecciones concomitantes,...)

Tradicionalmente, las infecciones por CPV se han producido en cachorros de 4 – 12 semanas de edad, cuando la inmunidad maternal está disminuyendo. Los adultos teóricamente deberían ser resistentes a la infección debido a la disminución de la susceptibilidad al virus por la edad y la presencia de inmunidad específica inducida por la vacunación o infecciones previas subclínicas. Recientemente se han dado casos graves también en animales adultos, incluso perfectamente vacunados, la mayoría asociados a CPV-2c (Kapil et al., 2007; Cavalli y col., 2001; Decaro y col., 2008, 2009).

3.8. Parvovirus canina: la enfermedad:

Las enteritis agudas por parvovirus pueden presentarse en perros de cualquier raza, edad o sexo, pero los cachorros entre 6 semanas y 6 meses parecen los más susceptibles (Desario y col., 2005; Goddard et Leisewitz, 2010). La inmunidad tras la infección por CPV o tras la vacunación es muy duradera, por lo que los animales más susceptibles son los cachorros. Durante las primeras semanas de vida, éstos están protegidos frente a las infecciones por anticuerpos maternos. Estos anticuerpos frente a parvovirus tienen una vida media aproximada de 10 días, por lo que cuando los títulos comienzan a disminuir, los cachorros son más susceptibles de infección. Los factores predisponentes a la infección por parvovirus en cachorros son la falta de inmunidad protectora, parásitos intestinales y condiciones ambientales estresantes y poco higiénicas. Existen ciertas razas que han demostrado tener mayor riesgo de enteritis severa por CPV, entre las que se encuentran el rottweiler, doberman pinscher, American pit bull terrier, labrador retriever y pastor alemán. Las razones por las que estas razas son más susceptibles son desconocidas, aunque se han propuesto mecanismos de inmunodeficiencia congénita implicados en esta predisposición (Prittie, 2004; Houston y col, 1996; Glickman y col, 1985; Goddard et Leisewitz, 2010). Además del componente genético, existen otros factores que aumentan el riesgo de padecer la

enfermedad, como por ejemplo el aumento de ejemplares de determinada raza en la sociedad y la falta de adecuados protocolos de vacunación. En los animales mayores de 6 meses, parece que los machos enteros son más susceptibles de padecer la enfermedad (Houston y col., 1996). En cuanto a la época del año, parece que existe un pico de mayor incidencia de la enfermedad durante los meses de verano.

Esta patología es una de las enfermedades infecciosas con mayor prevalencia en los perros entre 6 y 12 semanas de vida (Desario y col., 2005), pero también puede afectar perros de mayor edad.

3.8.2.2. Patogenia:

El parvovirus canino se propaga rápidamente en las poblaciones caninas por ruta fecal-oral (transmisión directa) o por exposición oronasal a comités contaminados con heces (transmisión indirecta). La excreción fecal se produce 3 días post inoculación experimental, y el virus continúa excretándose por heces por un periodo máximo de 3 – 4 semanas tras la enfermedad clínica o subclínica (Goddard et Leisewitz, 2010). La replicación del virus se produce en el tejido linfoide de la orofaringe, ganglios linfáticos mesentéricos y timo, y se extiende a las criptas intestinales del intestino delgado por diseminación hematológica. La viremia en sangre se observa de 1 – 5 días tras la infección (Lamm, C. y col, 2008). Tras esta fase de viremia, EPV-2 se localiza principalmente en el epitelio de la lengua, cavidad oral y esófago, intestino delgado, médula ósea y tejido linfoide (timo y linfonódulos). A pesar de esto, el virus se ha aislado también de pulmones, hígado, bazo, riñones y miocardio, demostrando que la enfermedad por parvovirus es una enfermedad sistémica. Parece que la tasa de crecimiento de las células intestinales y de los linfocitos determina la severidad de la enfermedad. Las tasas altas de crecimiento están relacionadas con una mayor replicación vírica y destrucción celular. Los factores estresantes, sobre todo la presencia de parásitos y el destete, pueden predisponer a los cachorros a padecer la enfermedad ya que aumenta la actividad celular de la mucosa. Durante el destete, los enterocitos de las criptas intestinales tienen un alto índice mitótico debido a los cambios en la flora bacteriana y la dieta, por lo que son más susceptibles al tropismo vírico hacia las células en rápida división.

Las células en proceso de maduración del epitelio de las criptas intestinales migran normalmente del epitelio germinal de las criptas hacia la punta de las vellosidades intestinales. Cuando están aquí adquieren su capacidad de absorción y de asimilación de nutrientes. El parvovirus infecta al epitelio germinal de las criptas intestinales, produciendo destrucción del epitelio y colapso de las vellosidades. Como resultado, el recambio normal celular (que se produce de 1 a 3 días en condiciones normales en el intestino delgado), se interrumpe, dando lugar a la lesión característica de acortamiento de las vellosidades y atrofia de las mismas. En esta fase se pierde la capacidad de absorción de las vellosidades intestinales, produciéndose una enteritis profunda y diarrea profusa. (Truyen, 2000). Se producen también cambios muy severos en el timo, sobre todo en los centros germinales y en la corteza del timo, reflejando el tropismo del CPV por tejidos con alto índice mitótico. Se produce linfocitólisis en la corteza tímica, lo que lleva a los animales a presentar una linfopenia muy severa (Goddard et Leisewitz, 2010). Se produce una disminución en el número de linfocitos, pero apenas se ven disminuidas los eosinófilos, basófilos, monocitos y el recuento total de glóbulos rojos (Truyen, 2000).

Debido a las diarreas y los vómitos, se produce una deshidratación severa en los animales y requiere un tratamiento temprano con fluidoterapia intravenosa con soluciones electrolíticas. Existe una pérdida de peso manifiesta en estos animales. El virus es excretado en las heces de los animales infectados que actúan como reservorio de la infección. La alta resistencia del virus a condiciones ambientales extremas, y su resistencia a los desinfectantes más comunes permiten que pueda mantenerse viable en el ambiente por largos períodos de tiempo (Truyen, 2000).

3.8.2.3. Signos clínicos:

3.8.2.1. Gastroenteritis por parvovirus:

Es el cuadro más frecuente y de más rápida evolución. Suele producirse en animales mayores de 2 meses de edad. Los síntomas más comunes son anorexia, depresión, fiebre, vómitos y diarrea sanguinolenta y maloliente, los cuales producen a su vez una marcada pérdida de peso y deshidratación. El daño que se produce en el

tracto intestinal secundario a la infección vírica aumenta el riesgo de translocación bacteriana y septicemia por *E. Coli* de forma secundaria, que puede producir un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), progresando a un shock séptico y a la muerte del animal. *E. Coli* se ha aislado de pulmones e hígado de animales infectados (Turk y col, 1990). Algunos autores han sugerido que la diarrea hemorrágica es una consecuencia directa de la endotoxemia y de la producción de citokinas y no de la infección vírica (Isogai y col, 1989).

En el hemograma puede aparecer una leucopenia transitoria marcada, con recuentos de entre 500 – 2000 WBC/ μ l. Esta leucopenia se debe a la destrucción de las células hematopoyéticas progenitoras de leucocitos en la médula ósea y otros órganos linfoproliferativos, como el timo, linfonódulos y bazo. La linfopenia suele ser más frecuente que la neutropenia. Puede aparecer anemia debido a aplasia medular, aunque no es un signo típico de la enfermedad (Sultanum y col., 2009). Esta anemia se produce principalmente por una combinación entre las hemorragias intestinales y la terapia de rehidratación (Goddard et Leisewitz, 2010). La trombocitopenia inducida por virus puede producirse por disminución de la producción de plaquetas o como resultado directo de la acción del virus o del sistema inmune en las plaquetas o el endotelio (Goddard et Leisewitz, 2010). En estos animales suele producirse trombocitopenia subclínica, que puede afectar a la permeabilidad vascular, pudiendo diseminarse el virus fuera de los vasos. Se ha documentado también en cachorros con parvovirus un estado de hipercoagulabilidad no asociada a coagulación intravascular diseminada, debido a un efecto procoagulante de las endotoxinas y las citokinas en las células endoteliales (Otto y col, 2000).

En la sangre de los animales infectados existen endotoxinas y factor de necrosis tumoral y parece que existe una asociación entre el aumento de estas sustancias en sangre y la mortalidad de los animales (Otto y col, 1997). Las endotoxinas y las citokinas proinflamatorias son mediadores de la respuesta inflamatoria sistémica y activan la cascada de la coagulación (Goddard et Leisewitz, 2010).

La respuesta de las glándulas adrenales y el tiroides en enfermos críticos es esencial para la supervivencia del animal: los niveles altos de cortisol sérico y los niveles bajos de tiroxina sérica a las 24 y 48 horas tras la hospitalización están asociados a una

mayor mortalidad (Schoeman y col, 2007; Schoeman, J. et Herrtage, M.E., 2008; Kalli y col, 2010).

Las alteraciones inducidas en la bioquímica por la infección por CPV no son específicas. Puede producirse una hipocalcemia severa debido a la anorexia, los vómitos y la diarrea, que puede contribuir al decaimiento del paciente. Pueden aparecer otras alteraciones en los electrolitos debido a estos síntomas, como hiponatremia e hipocloremia (Kalli y col, 2010). La hipoalbuminemia existente por la pérdida de albúmina debido a las diarreas, puede contribuir a la reducción de las concentraciones de calcio sanguíneo. La electroforesis de proteínas séricas en estos animales muestra hipoalbuminemia, hipogammaglobulinemia e hiper-alfa2-gammabobulinemia. El aumento en las alfa2-globulinas parece producirse por la síntesis hepática de proteínas de fase aguda estimuladas por los mediadores endógenos leucocitarios (Broek, A.H., 1990; Mazzaferro, E. M. y col., 2002). Algunos estudios han demostrado que los niveles altos de las proteínas de fase aguda, como por ejemplo la proteína C-reactiva, evaluados 12 y 24 h tras la hospitalización del animal, indican una mayor mortalidad en estos animales. Pueden encontrarse valores elevados de urea, creatinina y fósforo inorgánico, pero no asociados al parvovirus sino a la deshidratación. Las elevaciones de la fosfatasa alcalina y la alanina aminotransferasa se producen como resultado de una hipoxia hepática secundaria a la hipovolemia, aunque se ha postulado que puede ser también debido a la absorción de sustancias tóxicas debido a la pérdida de la barrera intestinal. La hipocolesterolemia puede utilizarse en estos animales como un indicador de la gravedad de la enteritis que sufren. Las lipoproteínas plasmáticas se unen a la porción bioactiva de las moléculas de endotoxinas, evitando que estimulen los monocitos y macrófagos, regulando así la respuesta del hospedador a las endotoxinas; existen diversos estudios donde se muestra una correlación entre las concentraciones plasmáticas bajas de colesterol y la mortalidad en humanos; recientemente, se ha demostrado en pacientes con CPV que los niveles de colesterol total y las lipoproteínas de alta densidad (HDL) disminuyen en suero (Yilmaz, Z. et Senturk, S., 2007).

Los estudios sobre el equilibrio ácido-base en estos animales han mostrado la existencia de acidosis o alcalosis según la severidad de los vómitos o del origen de la

diarrea (Heald y col., 1986; Goddard et Leisewitz, 2010). En la mayoría de casos se observa una acidosis metabólica, posiblemente por la pérdida excesiva de bicarbonato por el tracto intestinal (Nappert y col., 2002; Goddard et Leisewitz, 2010). Generalmente esta acidosis metabólica se compensa por la producción de lactato por las bacterias del intestino grueso (Nappert y col., 2002; Goddard et Leisewitz, 2010). Existen presentaciones hiperagudas, produciéndose la muerte del animal incluso 24 h tras la aparición de los signos clínicos, sobre todo en animales jóvenes. La recuperación del estado normal del intestino delgado puede requerir un período de dos o tres semanas después de la infección, momento en el cual el animal comienza a recuperar su peso normal. Los cuadros de parvovirus pueden verse también exacerbados por infecciones concurrentes con Giardias, Ancilostomas, y Coronavirus canino entre otros (Truyen, 2000).

3.8.2.2. Cuadro neurológico:

La coagulación intravascular diseminada (CID), la hipoglucemia, las alteraciones electrolíticas debidas a la gastroenteritis y la sepsis pueden producir alteraciones neurológicas. Además, si la infección es en la fase prenatal, puede producirse hipoplasia cerebelar y leucoencefalopatías como leucodistrofias, hipomielinización o degeneración espongiiforme. (Agungpriyono y col, 1999; Schaudien y col., 2010).

3.8.2.3. Miocarditis:

En los cachorros infectados durante la gestación o aquellos menores de 6 semanas de edad, puede producirse miocarditis aguda con alta mortalidad (Lenghaus y col, 1980; Robinson y col, 1980; Agungpriyono y col, 1999; Zini y col, 2009), presentándose los síntomas cardiacos generalmente antes de los intestinales o instaurándose un fallo cardiaco congestivo y muerte del animal. Se han descrito algunos casos en los que se produce un cuadro digestivo, una recuperación aparente y el animal muere semanas o un mes después de su recuperación por un fallo cardiaco congestivo.

3.8.2.4. Enfermedad cutánea:

En medicina humana las causas que producen un eritema multiforme son variadas, siendo las más frecuentes reacciones medicamentosas y herpesvirus. Se han relacionado otros agentes víricos en esta enfermedad con el parvovirus B19. En la especie canina, se ha asociado eritema multiforme en perros con parvovirus (Favrot y col, 2000), en los que la infección por parvovirus de la epidermis y los queratinocitos de la mucosa producen una apoptosis de los linfocitos asociados y signos clínicos de eritema multiforme. Los animales presentan ulceraciones en las almohadillas, puntos de presión, mucosa vaginal y oral. Además aparecen parches eritematosos en el abdomen. Es una forma muy poco frecuente.

3.8.2.5. Portadores asintomáticos:

En los perros de edad avanzada, en cachorros correctamente inmunizados o en aquellos expuestos a una baja concentración vírico (ya que la severidad de la infección está relacionada a la cantidad de virus a la que el animal se expone), pueden presentarse los animales como portadores asintomáticos. . En estos casos el perro disemina el virus, lo que evita que se pueda tomar las precauciones adecuadas. Del mismo modo, los individuos infectados pueden excretar el virus antes de manifestar los signos clínicos de la enfermedad, así como hasta tres semanas después de haber adquirido la infección y estar en fase de recuperación.

3.8.3 Anatomía patológica e histopatología:

Esta enfermedad produce una gran variedad de cambios macroscópicos e histológicos, que varían de mínimos a severos. En la necropsia se observa frecuentemente enteritis segmental, apareciendo la serosa de las áreas afectadas enrojecida y engrosada, y la mucosa lisa y brillante debido a la pérdida de vellosidades. El intestino delgado generalmente contiene heces líquidas que varían de color amarillo a hemorrágicas.

El virus infecta más frecuentemente las partes proximales del intestino delgado en las primeras fases y progresa de forma segmentaria por todo el intestino delgado. El intestino grueso no suele verse involucrado. En casos agudos puede aparecer necrosis multifocal de las criptas y cuerpos de inclusión intranuclear en el intestino. Según

progresar la enfermedad, hay una pérdida de la arquitectura de las criptas, con acortamiento de las vellosidades intestinales, fusión o desprendimiento de las mismas y regeneración de las criptas. En casos crónicos, no suelen verse inclusiones, correspondiéndose esto a una detección menor de antígeno de CPV 2. Suelen existir infecciones bacterianas secundarias y pueden jugar un papel muy importante en la mortalidad de los animales con esta enfermedad.

Aunque los mayores cambios se producen en el intestino delgado, pueden aparecer inclusiones víricas en otros órganos, como en el corazón. Puede producirse miocarditis con cuerpos de inclusión intranuclear en animales jóvenes. Aparece también depleción de las líneas eritroide y mieloide en la médula ósea.

3.8.4 Diagnóstico:

En esta enfermedad, el diagnóstico precoz es muy importante, sobre todo en colectividades, para aislar a los animales infectados y evitar la diseminación de la enfermedad. El diagnóstico clínico se realiza en consulta mediante la observación de los signos clínicos típicos de la enfermedad, aunque éstos pueden ser producidos por otros patógenos como coronavirus, adenovirus, morbillivirus, rotavirus, reovirus, norovirus,... (Greene y Decaro, 2014), por lo que es imprescindible un examen laboratorial. Se han desarrollado distintos métodos para el diagnóstico laboratorial de CPV, que suelen basarse en muestras de heces (o contenido intestinal en animales fallecidos) de los animales afectados. En los primeros estadios de infección se ha demostrado que las muestras de sangre en EDTA son más útiles (Decaro y col., 2005). Dentro de los exámenes de laboratorio utilizados para el diagnóstico de Parvovirus canino se encuentran:

3.8.4.1. Métodos tradicionales:

A. Inmunocromatografía (IC):

Método de diagnóstico utilizado por su simple y rápido procedimiento. Se requiere grandes cantidades de antígeno vírico para que se produzca una señal claramente visible por lo que los resultados pueden ser afectados por la subjetividad

del operador (Desario y col., 2005). Los test que detectan antígenos víricos mediante métodos basados en los anticuerpos están disponibles en las clínicas veterinarias de forma habitual, constituyendo un método sencillo, económico fiable. Su sensibilidad se ha demostrado que es menor que las técnicas moleculares. Algunos estudios indican que los test SNAP sólo detectan un 46 % de los animales infectados (Desario y col., 2005), y esto puede deberse a que la carga vírica en heces sea baja, ya que el virus sólo se detecta en heces de 10 a 12 días postinfección. Los estudios más recientes que comparan los test comerciales basados en anticuerpos con PCR y microscopía electrónica confirman la alta especificidad y baja sensibilidad de estos test (Schmitz y col., 2009). Los métodos inapropiados de vacunación, así como las vacunas vivas modificadas pueden dar lugar a falsos positivos en dichos test. Parece ser que ha habido un aumento en los fallos de estos test a medida que ha ido emergiendo CPV-2c, esto hace pensar que los test actuales tienen reacciones cruzadas bajas con CPV-2c (Kapil y col., 2007). Algunos autores han sugerido que deberían revisarse los anticuerpos monoclonales que contienen los test debido a las mutaciones detectadas en las cepas que circulan actualmente (Hong y col., 2007). Sin embargo, estudios más recientes realizados mediante test inmunocromatográficos, en muestras de las tres variantes de CPV han demostrado que la tasa de detección de CPV-2c es similar a las de 2a y 2b (Decaro y col., 2010). Debido a la relación existente entre los parvovirus de los carnívoros, los test desarrollados para CPV son capaces de detectar FPV (Neurer y col., 2008)

B. Microscopía electrónica (ME) directa a partir de muestras fecales.

En general, para realizar un diagnóstico con esta técnica se requiere alrededor de 103 partículas víricas por gramo de heces (Roseto y col., 1980). Su sensibilidad es baja, aunque pueden concentrarse partículas víricas en técnicas de microscopía inmunoelectrónica. Asimismo, se trata de una técnica costosa y que requiere equipamientos y manejo especiales.

C. Hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación:

Debido a que los parvovirus presentan la propiedad de unión a ácido siálico (SA), la prueba de hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación (HA-HI) se puede utilizar como método de diagnóstico. Éste es un método simple y rápido para detectar el virus en materia fecal y en muestras de tejidos. Sin embargo, su utilización se ve obstaculizada por el hecho de que existen cepas carentes de actividad de hemoaglutinación (Cavalli y col., 2001). Además, esta técnica suele ser menos sensible que la ME o el ELISA (Truyen, 2000). Se requieren eritrocitos frescos para esta prueba, por lo que es necesario tener sangre fresca de cerdo o animales donantes disponibles. Pueden utilizarse eritrocitos de otras especies, como gatos o monos, pero son más difíciles de obtener o más caros.

D. Aislamiento vírico:

También puede realizarse aislamiento vírico (VI) para el diagnóstico de CPV-2 utilizando varias líneas celulares de origen felino y canino. Se requiere un periodo de incubación largo (de 5 a 10 días) y un test adicional de las muestras por inmunofluorescencia o hemoaglutinación para detectar los antígenos víricos. Esta metodología es más sensible que las técnicas anteriormente descritas, aunque es poco utilizada como técnica de diagnóstico ya que se requiere como mínimo una semana para obtenerse el resultado y sólo puede realizarse en laboratorios especializados (Desario y col., 2005). Además, se requiere que las partículas víricas se encuentren intactas para que puedan ingresar a las células y realizar su ciclo replicativo.

3.8.4.2. Métodos moleculares: reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En la actualidad, la PCR es una de las metodologías más ampliamente utilizadas como diagnóstico molecular, permitiendo la rápida generación in vitro de millones de copias idénticas de la secuencia de DNA original. Se trata de una técnica altamente sensible ya que requiere unas pocas moléculas del DNA de interés para comenzar con la amplificación. Asimismo, presenta una gran especificidad dada por la utilización de cebadores específicos que se hibridan con la secuencia complementaria en el DNA

molde. Utilizando procedimientos sencillos de extracción de DNA a partir de materia fecal, esta técnica comenzó a ser empleada como método de diagnóstico de CPV-2 en 1995 (Schunck y col., 1995). Recientemente se ha desarrollado para la detección y cuantificación de Parvovirus canino, una técnica de PCR en tiempo real (rt-PCR) basada en la tecnología Taqman de sondas específicas de hibridación, la cual mostró ser altamente específica, sensible y reproducible, así como más rápida que el método convencional basado en la PCR a tiempo real (Decaro y col., 2005). Además de detectar y cuantificar el virus, la tecnología Taqman permite simultáneamente caracterizar la variante de CPV-2 presente en la muestra, prescindiendo de técnicas adicionales (análisis de patrones de restricción y secuenciación) requeridas con la PCR convencional. No obstante, el alto costo de los equipamientos y reactivos necesarios para llevar a cabo el diagnóstico por rt-PCR impide que muchos laboratorios dispongan de dicha técnica. Además, para la caracterización de nuevas cepas es conveniente obtener la secuencia de los amplicones por métodos convencionales de PCR y secuenciación, ya que esto nos brinda mayor información sobre la variabilidad del genoma vírico.

3.8.5. Caracterización de la cepa vírica:

Desde el punto de vista práctico, el aislamiento y la determinación de la cepa vírica tiene un interés limitado para los clínicos, ya que el tratamiento de soporte y el pronóstico es similar, independientemente de la cepa vírica que afecte al animal. La caracterización de los virus sí que tiene interés desde el punto de vista epidemiológico.

3.8.5.1. Métodos tradicionales:

Desde los orígenes de su descubrimiento se ha utilizado para la caracterización de las cepas la inhibición de la hemaglutinación combinada con anticuerpos monoclonales. Se desarrolló un panel de cuatro anticuerpos monoclonales para la caracterización de FPV, CPV-2, CPV-2a y CPV-2b (A4E3, B4A2, C1D1 y B4E1). Se pueden distinguir CPV-2a de 2b debido a la falta de reacción del anticuerpo B4A2 frente a 2b; este anticuerpo monoclonal no es capaz de reconocer CPV-2c. Se desarrolló en 2004

otro anticuerpo monoclonal capaz de distinguir las variantes 2c de las 2b (Nakamura et al., 2004). Estas técnicas deberían aplicarse idealmente sólo en muestras fecales con una actividad óptima de hemaglutinación o en aislados obtenidos de cultivos celulares. Sólo pueden caracterizarse muestras con títulos de hemaglutinación mayores a 1/64.

3.8.5.2. Métodos moleculares:

En el año 2000 se desarrolló una PCR para genotipar las cepas de CPV (Pereira y col., 2000). Debido al limitado número de variaciones de nucleótidos entre CVP-2a y 2b, se seleccionaron los primers específicos de 2b en función de 2 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs): A4062T y G4449A, que determinan la sustitución de asparagina por ácido aspártico en la posición 426 y de isoleucina por valina en la posición 555, en tipos 2a y 2b respectivamente. Las cepas circulantes actualmente tienen la mutación I555V, debido a un cambio en nucleótidos G4449A (Martella y col, 2006), por lo que la PCR anteriormente desarrollada no es capaz de distinguir algunas cepas de 2a, caracterizándolas como CPV-2b. Además, el tipo 2c no es detectable, ya que la sustitución D426E se debe al cambio (T→A) en la tercera posición del codón, en el nucleótido 4064, por lo que este mutante era reconocido erróneamente como tipo 2b (Buonavoglia y col., 2001).

Para distinguir CPV-2c se desarrolló una PCR-RFLP utilizando una enzima MbolI. Esta PCR no es capaz de diferenciar CPV-2b de 2a, ya que ambos tipos no son digeridos por la encima MbolI (Buonavoglia y col., 2001). Además, se detectaron cepas en Hungría reconocidas como 2c, que resultaron ser 2a, debido a que tenían una mutación en VP2 que introducía un sitio de restricción para la enzima MbolI (Demeter y col., 2010).

El análisis de la secuencia de los virus amplificados por PCR convencional mediante los primers 555for/555rev (Buonavoglia y col., 2001), muestra el aminoácido presente en el residuo 426 de la proteína VP2, permitiendo distinguir entre CPV-2a, 2b y 2c, pero no entre CPV-2 original y 2a.

Se han desarrollado 2 PCR a tiempo real basadas en las sondas MGB (minor Groove binder), diseñadas para reconocer polimorfismos de un solo nucleótido existentes entre los tipos 2a/2b (A4062T) y entre 2b/2c (T4064A) en el codón 426 de la

proteína VP2 (Decaro y col., 2005, 2006) Estas PCR tienen alta sensibilidad y son fácilmente reproducibles. En 2009 han aparecido cepas de CPV-2c que no han sido caracterizadas por estas PCR, ya que presentan una mutación en la región donde debe unirse la sonda y no permite la hibridación correcta de la sonda MGB (Decaro et al., 2009). Debido a estos hallazgos, aumenta la necesidad de actualizar los métodos de tipificado de CPV basados en polimorfismos de un solo nucleótido, ya que otras mutaciones pueden dificultar la caracterización correcta de la cepa. Esto refuerza las teorías que sugieren que las técnicas de diagnóstico molecular deberían dirigirse a regiones más conservadas del DNA para evitar falsos negativos (Decaro y col.),

3.8.6. Tratamiento:

Las tasas de supervivencia en animales con parvovirus son muy variables, desde el 9% en animales sin tratamiento hasta el 90% en animales con tratamiento intensivo (Goddard et Leisewitz, 2010; Kalli y col, 2011). No existe un tratamiento específico frente al agente infeccioso, por lo que se requiere un tratamiento de soporte frente a la gastroenteritis. Se recomienda un tratamiento agresivo con hospitalización del animal, administración de fluidoterapia intravenosa con cristaloides y/o coloides, tratamiento de la hipoglucemia y los desequilibrios electrolíticos, antibioterapia, antieméticos y analgesia intravenosa, nutrición parenteral y antihelmínticos. La fluidoterapia en los animales más graves es fundamental para tratar la deshidratación, restablecer el volumen sanguíneo circulante y corregir los desequilibrios electrolíticos. La administración de fluidos en estos animales es compleja, tanto por el tipo de fluido a administrar como por la vía de administración a elegir (Brown, A.J., et Otto, C.M., 2008, Goddard et Leisewitz, 2010). La vía de administración preferentemente debería ser la intravenosa, aunque puede utilizarse la vía intraósea en aquellos pacientes que necesitan una rehidratación de forma urgente y la cateterización intravenosa es imposible. Es muy importante en estos pacientes que la cateterización intravenosa sea aséptica, así como el cuidado del catéter también, ya que la infección inducida por los catéteres es una complicación muy grave en estos animales inmunocomprometidos, describiéndose desde abscesos y celulitis en el punto de inyección, hasta poliartritis séptica y discospondilitis. Estos catéteres deben ser cambiados cada 72 horas. Puede

utilizarse la vía subcutánea o intraperitoneal en los casos de deshidratación moderada, pero está contraindicada cuando exista un compromiso circulatorio ya que, al existir vasoconstricción periférica, la distribución de los fluidos no va a ser la adecuada. Además existe un mayor riesgo de infección en los animales con leucopenia severa (Brown, A.J., et Otto, C.M., 2008, Goddard et Leisewitz, 2010). Generalmente el fluido de elección es una solución electrolítica balanceada, isotónica con la sangre, como las soluciones de lactado de Ringer. La velocidad de administración de los fluidos depende del estado del paciente, pero el volumen de deshidratación debe ser repuesto lo antes posible, durante las primeras 6 horas de hospitalización. Cuando se ha restaurado la hidratación adecuada y la perfusión del paciente, la velocidad de administración se reduce a mantenimiento, añadiendo el volumen de pérdidas estimadas según los vómitos o diarreas que presente el animal.

Los enfermos de CPV suelen desarrollar hipokalemia e hipoglucemia, sobre todo las razas miniatura, debido a la anorexia, vómitos y diarrea. La hipokalemia severa puede producir debilidad muscular, íleo paralítico, arritmias cardíacas y poliuria (Prittie, J., 2004). Los niveles séricos de potasio y glucosa, así como el volumen total de glóbulos rojos y las proteínas séricas, deberían monitorizarse por lo menos una vez al día. Puede añadirse cloruro potásico a la fluidoterapia en función de los requerimientos del paciente. La cantidad de cloruro potásico debe calcularse con precisión y no debe ser mayor de 0'5 mEq/kg/h, ya que puede tener efectos adversos en la función cardíaca (Brown, A.J., et Otto, C.M., 2008, Goddard et Leisewitz, 2010). Puede suplementarse con dextrosa la solución electrolítica balanceada hasta una concentración final de 2.5 – 5% para prevenir la hipoglucemia, una vez que se ha corregido la hipoglucemia inicial.

Los animales con gastroenteritis por CPV desarrollan frecuentemente una enteropatía con pérdida de proteínas muy severa, debido a la destrucción de las vellosidades intestinales, por lo que se pueden añadir coloides al tratamiento (como hetastarch o dextrano 70), cuando las proteínas totales están por debajo de 3,5 mg/ml (o la albumina está por debajo de 2 mg/ml) o los pacientes presentan pérdidas de fluidos al tercer espacio. Deben evitarse los tratamientos excesivos con coloides para prevenir una reducción en la producción endógena de albúmina por parte del hígado.

Existe gran controversia en cuanto a la administración de hemoconcentrados y derivados en el tratamiento del parvovirus. Los pacientes que tienen anemia secundaria a la diarrea hemorrágica o por en endoparasitismo concurrente y muestran signos clínicos debidos a la anemia, pueden recibir transfusiones de sangre completa o concentrados de glóbulos rojos. La transfusión de plasma fresco congelado se ha recomendado en el tratamiento clásico de CPV debido a su capacidad de administrar albúmina, inmunoglobulinas e inhibidores de las proteasas séricas, que pueden neutralizar los virus circulantes y controlar el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica asociado a esta enfermedad (Mazzaferro y col, 2002; Goddard et Leisewitz, 2010). Sin embargo, existen estudios que indican que es necesaria una gran cantidad de plasma para conseguir un pequeño aumento de albúmina plasmática (Mazzaferro y col, 2002; Brown, A.J. et Otto, C.M., 2008; Goddard et Leisewitz, 2010). Debido a los conocimientos existentes sobre inmunomodulación y reacciones transfusionales, a la falta de eficacia y a la disponibilidad de coloides sintéticos, no se recomienda el plasma fresco congelado como tratamiento para aumentar la presión oncótica o los niveles de albúmina sérica. Estudios recientes muestran que no existe una mejoría en los signos clínicos, en la reducción de la viremia ni en los parámetros sanguíneos mediante la administración de plasma fresco congelado (Bragg y col, 2012), lo que contradice las teorías anteriores en la que se sugería una inmunización pasiva mediante la administración de plasma hiperinmune.

Tradicionalmente se ha recomendado un ayuno de 24 a 72 horas en la hospitalización de estos pacientes. Hay estudios que demuestran que los cachorros que reciben nutrición enteral temprana por una sonda nasoesofágica (comparados con aquellos que permanecen en ayunas hasta que cesan los vómitos), se recuperan antes, tienen una mayor ganancia de peso y recuperan la barrera intestinal más rápido, lo cual puede limitar la translocación bacteriana y la absorción de endotoxinas (Mohr, A.J. y col, 2003). La dieta en fases iniciales debe ser fácilmente digestible, en pocas cantidades y administrada frecuentemente a lo largo del día, aunque existan vómitos. La dieta normal se instaurará paulatinamente.

Las coinfecciones con parásitos intestinales pueden exacerbar la enteritis parvovírico, favoreciendo la renovación celular del intestino y la replicación vírica de

forma secundaria, por lo que debe adoptarse un tratamiento antiparasitario vía oral en cuanto cesen los vómitos.

Los vómitos en estos pacientes están causados por la destrucción de las criptas intestinales, la motilidad intestinal alterada, y la activación de la cascada de las citoquinas inducida por las endotoxinas, que produce una irritación local y una activación central del centro del vómito y la zona gatillo quimiorreceptora (Mantione, N.L., Otto, C.M., 2005). Los vómitos persistentes agravan la pérdida de fluidos y electrolitos, interfieren con el soporte nutricional y retrasan la administración oral de fármacos. Los antieméticos que se utilizan más frecuentemente son metoclopramida, procloperacina y ondansetrona. Metoclopramida es un antagonista dopaminérgico que bloquea la zona gatillo quimiorreceptora, estimula y coordina la motilidad del tracto intestinal superior y aumenta la presión del esfínter esofágico inferior. Puede utilizarse con precaución en pacientes con riesgo de intususcepción intestinal. Procloperacina es un derivado fenotiacínico que disminuye la estimulación de la zona gatillo quimiorreceptora. La ondansetrona es un antagonista de los receptores 5-HT₃ que inhibe el vómito a nivel central y periférico (Mantione, N.L., Otto, C.M., 2005). Algunos estudios retrospectivos han mostrado que la mayoría de antieméticos no controlan totalmente el vómito, y los cachorros que reciben estos fármacos generalmente requieren un mayor tiempo de hospitalización. En estos estudios concluyeron que, aunque algunos animales muy enfermos necesitan drogas antieméticas, las complicaciones como la hipotensión, signos de depresión y la modulación de la respuesta inmune pueden contribuir probablemente a aumentar los periodos de hospitalización. Aunque este estudio parece demostrar una asociación entre los fármacos antieméticos y una hospitalización más prolongada, no se ha podido establecer una relación causa-efecto (Mantione, N.L., Otto, C.M., 2005). Por esto, los fármacos antieméticos están indicados en el tratamiento de esta enfermedad en cualquiera de los casos.

Es necesario añadir al tratamiento una antibioterapia intravenosa con antibióticos bactericidas de amplio espectro, debido a la disrupción de la barrera intestinal y la leucopenia severa. Puede combinarse un antibiótico beta-lactámico o penicilinas resistentes a la beta-lactamasa, con aminoglucósidos. Existe la posibilidad

de que los antibióticos aumenten la liberación de endotoxinas y que se exacerbe la respuesta inflamatoria sistémica. Puede añadirse metronidazol al tratamiento, sobre todo cuando se detecten protozoos en extensiones fecales.

Los últimos tratamientos propuestos tienen como objetivo la inmunoterapia. Se ha investigado el factor estimulante de colonias humano (rhG-CSF), en cachorros enfermos de CPV con leucopenia muy severa. No se ha demostrado ningún beneficio hasta la actualidad en animales tratados con estas sustancias (Rewerts, J.M. y col 1998; Mischke, R. y col, 2001).

El interferón modula funciones de la inmunidad celular y humoral, y afecta a la replicación del virus. Debido a la falta de interferones caninos, se han realizado estudios con interferón omega recombinante felino, que han demostrado la mejora del cuadro clínico en animales con parvovirus y una disminución de la mortalidad (Ishiwata, K. y col, 1998; Martin, V., y col 2002; Mari, K. y col 2003).

Se han probado fármacos antivíricos como el oseltamivir, que inhibe la neuraminidasa. El parvovirus canino no depende de la neuraminidasa para su replicación, por lo que el estudio no demuestra una mejora en los pacientes ni una disminución en los días de hospitalización (Savigny, M.R. et Macintire, D.K., 2010).

3.8.7. Vacunación y prevención:

Los protocolos de inmunización efectiva son esenciales para la prevención de las infecciones en los cachorros. Las concentraciones de anticuerpos séricos están directamente relacionadas con la inmunidad. En los mamíferos, los anticuerpos son transferidos a los neonatos a través de la placenta y el calostro. Estos anticuerpos maternos juegan un papel muy importante en la protección del neonato, pero también están considerados como una de las causas principales de fallos en la inmunización. Los cachorros reciben aproximadamente el 90 % de los anticuerpos maternos protectores frente a CPV del calostro materno. A pesar de la baja transferencia de anticuerpos frente a parvovirus por la barrera placentaria, la cantidad es suficiente incluso para que se produzcan fallos en inmunización en cachorros que no han recibido calostro materno. Los títulos de anticuerpos maternos en los cachorros disminuyen exponencialmente con el tiempo. La vida media de los anticuerpos

maternales frente a CPV es aproximadamente de unos 10 días. La cantidad de anticuerpos maternos que bloquean la inmunización activa es menor que la necesaria para prevenir una infección con los virus de campo. Ante la presencia de anticuerpos maternos, la efectividad de la vacunación varía del 25 % en animales de 6 semanas, hasta el 95 % en animales de 18 semanas. Tras una infección, los animales mantienen altos títulos de anticuerpos por lo menos 16 meses, quedando la mayoría inmunizados de por vida frente a la cepa infectante de CPV.

Las vacunas atenuadas de origen canino, que contienen altos títulos de CPV con bajos pases, son las vacunas de elección actualmente. Se ha demostrado protección cruzada completa entre CPV-2, 2a y 2b. El protocolo de vacunación actual de CPV más utilizado recomienda 3 dosis de vacuna, a las 6, 9 y 12 semanas de edad (Waner, T., y col., 1996; Buonavoglia, C., y col 1992; Bergman, J.G. y col, 2006). Se ha documentado una buena protección con la utilización de vacuna viva-modificada 2b administrada intranasal (Martella y col., 2005).

Generalmente se realiza una vacunación de recuerdo anual, aunque esta vacunación es controvertida. Algunos estudios muestran que el 93,7% de perros vacunados muestran una respuesta adecuada tras 2 años desde la última vacunación (Twark, I., et Dodds, W.J., 2000). Los datos de inmunidad de perros que se han recuperado de la infección activa sugieren que la inmunidad tras la infección es muy prolongada, incluso de por vida. (Buonavoglia C. y col, 1992; Schultz RD y col, 2006). El riesgo de producir enfermedades inmunomediadas asociadas con sobrevacunación debe ser valorado, sobre todo en animales que ya han padecido la enfermedad. Existe gran controversia sobre si las vacunas existentes actualmente confieren protección cruzada frente a las infecciones producidas por las cepas de CPV-2c. Existen estudios recientes que muestran protección cruzada de 2 vacunas vivas modificadas, una de CPV-2 y otra de CPV-2b, frente a la cepa 2c (Larson, L.J. et Schultz, R.D., 2008)

Tras la vacunación puede producirse una enfermedad similar al parvovirus, aunque en la mayoría de los casos se ha comprobado que se debe a una infección con la cepa salvaje y no por la cepa vacunal (Decaro N y col, 2007).

El parvovirus es muy contagioso y puede provocar situaciones de emergencia en perreras y en criaderos. La diseminación del virus se produce durante varias

semanas, por lo que los animales afectados deben ponerse en cuarentena durante este periodo. Además, como el virus se puede diseminar mediante fómites, es necesario tener especial precaución entre los animales afectados y no afectados, sobre todo por el manejo del personal cuidador. El parvovirus es muy resistente a la inactivación y puede persistir en el medio desde meses a años. Muchos detergentes y desinfectantes no inactivan el parvovirus canino. El más efectivo es el hipoclorito sódico (la lejía doméstica), si la exposición al desinfectante es de, al menos, 1 hora.

3.8.7.1. Vacunación y protección cruzada:

Existe una amplia discusión sobre si las vacunas existentes en el mercado, la mayoría con la cepa original de CPV-2, confieren inmunidad suficiente para las distintas variantes antigénicas. En la mayoría de brotes de CPV-2c en adultos, éstos se encontraban vacunados correctamente con un protocolo de vacunación anual (Decaro y col, 2008, 2009). En animales jóvenes, en muchos casos se había completado el protocolo inicial de vacunación de animales jóvenes (Kapil y col., 2007; Pérez y col., 2007; Calderón y col., 2009; Ntafis y col., 2010; Castro y col, 2011; Filipov y col., 2011; Decaro et Buonavoglia, 2012): Muchos autores sugieren que las vacunas basadas en la cepa antigua de CPV-2 confieren una inmunidad protectora adecuada para las cepas circulantes actualmente. Por otra parte, otros investigadores afirman que la inmunidad inducida por estas vacunas es muy efectiva en el caso de infección por el virus homólogo al vacunal, pero la protección es baja en el caso de infecciones por el resto de variantes, por lo que permiten que cepas en teoría más patógenas produzcan infección y mortalidad en animales regularmente vacunados. Se ha demostrado que hay reacción cruzada entre las variantes antigénicas y la cepa original CPV-2. Se han realizado experimentos en los que animales a los que se ha administrado CPV-2 muestran niveles menores de anticuerpos neutralizantes frente al virus heterólogo con respecto al homólogo. Estos hallazgos se han confirmado con estudios de inhibición de hemaglutinación cruzada en perros y cobayas (Cavalli y col, 2008; Ohshima y col. 2008; Kang y col., 2008).

Otros estudios, sin embargo, muestran que las vacunas con la cepa “antigua” protegen adecuadamente incluso frente a la nueva cepa CPV-2c en condiciones

experimentales (Spibey y col., 2008, Siedek y col., 2011). Estos experimentos se han realizado en condiciones controladas, unas semanas tras la vacunación, cuando los anticuerpos generalmente alcanzan los niveles más altos (Decaro y col., 2005). No se han realizado estudios sobre la protección inducida por la cepa original frente a las variantes antigénicas tras un largo intervalo entre la vacunación y la infección, cuando los anticuerpos frente al tipo 2 han podido disminuir y no ser lo suficientemente elevados para prevenir eficientemente una infección y una enfermedad producida por una cepa de campo. Teniendo en cuenta que las diferencias antigénicas entre la cepa original y sus variantes puede disminuir la eficiencia de las vacunas basadas en CPV-2, se ha sugerido el uso de vacunas que contengan el virus circulante actualmente en el ambiente (vacunas basadas en tipo 2b, principalmente) (Pratelli y col., 2001; Martella y col., 2005; Cavalli y col., 2008; Decaro y col., 2008, 2009; Ohshima y col., 2008; Calderón y col., 2009; Ntafis y col., 2010; Castro y col., 2011). A pesar de todo, no hay una evidencia definitiva de la ausencia de protección cruzada entre las antiguas cepas y las nuevas variantes. Por tanto, la causa primaria de diseminación de estos virus a pesar de la vacunación generalizada se supone que se debe a interferencia con los anticuerpos maternos en cachorros o en la eficiencia baja de protección del sistema inmune en animales adultos.

Se ha abierto el mismo debate sobre vacunación en la población felina, debido al aumento de casos de panleucopenia producido por cepas de CPV-2 en animales vacunados frente a FPV. Existen estudios (Gamoh y col., 2005), en los que parece que las vacunas basadas en FPV son capaces de producir inmunidad protectora frente a una cepa virulenta de CPV.2b. Se han detectado pocos casos de CPV-2c en gatos.

IV.- OBJETIVOS

IV. Objetivos

El parvovirus canino tipo 2 está considerado como uno de los patógenos entéricos más importantes en la población canina debido a que produce brotes de enfermedad, con elevadas tasas de morbilidad y mortalidad. Por ello, se encuentra incluido en todos los protocolos vacunales de esta especie, siendo su inclusión “imprescindible” según las directrices preventivas propuestas por la WSAVA

Este virus ha sido un patógeno de rápida evolución en los últimos años, la aparición de la primera variante de parvovirus canino tipo 2, la 2a hacia 1980, se comunicó tan solo 2-3 años después de la primera descripción de la enfermedad. En la actualidad, parece haberse producido un cambio epidemiológico importante, asociado a la presentación clínica de la enfermedad, no sólo en cachorros, sino también en animales adultos. Asimismo, se ha postulado que existe un descenso en la restricción de hospedador, pudiendo los distintos tipos de virus circulantes causar infección y enfermedad en gatos. Debido a la aparición de nuevas variantes de virus en la especie canina se han venido comunicando fallos de protección por el desarrollo de una inmunidad parcial tras la administración de las vacunas incluidas en los distintos programas de vacunación.

En España, prácticamente no existen estudios orientados a vigilar la presencia de parvovirus canino tipo 2 o sus variantes, por ello el objetivo general de este trabajo fue detectar la presencia de los distintos tipos de virus y su aparición cronológica a lo largo de un periodo de tiempo o de 10 años (entre 2004-2013). Para ello se recogieron datos y muestras de los casos de enteritis compatibles con parvovirus caninos a partir de 2 fuentes: el servicio de microbiología y parasitología del Hospital Clínico Veterinario de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y el Hospital Clínico Veterinario Postas de Aranjuez, Madrid.

Para llevar a cabo este objetivo general, se diseñaron 2 objetivos específicos:

1. El primer objetivo específico del estudio consistirá en:

- El diseño de un estudio epidemiológico descriptivo de la casuística de parvovirus canino entre los años mencionados. Para ello se seleccionaran empleando distintos criterios, un número de muestras suficientemente significativo para cada nivel de selección. Las variables comunes de estudio serán: año, edad del animal, el sexo, la raza, el cuadro clínico, la mortalidad o supervivencia y el estatus vacunal. El programa estadístico de base será el SPSS.
- La elección de un test rápido de uso rutinario para la detección de la presencia de virus sobre muestra biológica, empleando 5 pruebas rápidas comerciales sobre un número representativo de ellas y comparar sus resultados mediante concordancia.

2. El segundo objetivo específico consistirá en la identificación y caracterización de cepas de parvovirus circulantes en nuestra área o entorno geográfico, a partir de las muestras incluidas en el estudio.

- Para ello en primer lugar se contrastarán los resultados obtenidos empleando el test de rutina seleccionado previamente con una técnica de PCR diseñada sobre un fragmento de la proteína mayoritaria de cápside la VP2, como prueba de referencia.
- Una selección de muestras será sometida a aislamiento mediante el empleo de 2 líneas celulares, una de origen canino y otra de origen felino, con la doble finalidad del aislamiento de virus y para estudiar su comportamiento in vitro sobre células de distinta especie animal, tanto homóloga como heteróloga.
- La identificación de la infección de los distintos tapices celulares se llevará a cabo mediante inmunofluorescencia, empleando un anticuerpo conjugado con fluoresceína.
- En una última fase se seleccionará una muestra anual representativa para secuenciar los virus detectados y caracterizar el tipo o la variante al que pertenecen.

V.- MATERIALES Y MÉTODOS.

V. Materiales y métodos:

1. Estudio de casos clínicos :

Para identificar las cepas circulantes de Parvovirus canino en nuestra área geográfica, se diseñó un estudio temporal de entre los casos clínicos remitidos para diagnóstico al Servicio de Microbiología y Parasitología (SERMIPA) del Hospital Clínico Veterinario (HCV) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), así como a consulta del Hospital Clínico Veterinario Postas en Aranjuez, Madrid.

El estudio se llevó a cabo empleando 105 muestras correspondientes a animales de la especie canina, que presentaron diversas características a lo largo de los últimos 10 años.

2. Muestras empleadas, procesado inicial y almacenamiento:

Se han recogido un total de 105 muestras de heces y órganos de animales de especie canina entre los años 2004 y 2013 en la Universidad Complutense de Madrid y en el Hospital Clínico Veterinario Postas,. Estas muestras corresponden a perros que han acudido a consulta de medicina interna debido a un cuadro de gastroenteritis aguda. De ese total de muestras, 103 de los animales han sido diagnosticados de parvovirus canina. Las muestras proceden del Hospital Clínico Veterinario Complutense (Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid) y del Hospital Clínico Veterinario Postas (Aranjuez, Madrid). Las procedentes de animales vivos consistieron en contenido intestinal/heces de animales enfermos, recolectadas en el momento de consulta o durante las primeras 24 horas de hospitalización del animal, tras la presentación aguda del cuadro clínico. En los casos en los que se produjo el fallecimiento del animal y en los casos remitidos directamente al servicio de Anatomía Patológica de la UCM por clínicas veterinarias externas, se ha utilizado

también un macerado de órganos consistente muestras de bazo, hígado, corazón, pulmón, cerebro, linfonódulos e intestino delgado y grueso.

Las muestras de contenido intestinal-heces, se sometieron en primer lugar a diagnóstico rápido diferencial empleando distintos test inmunocromatográficos comerciales. Una vez analizadas se clasificaron y conservaron a -80°C sin dilución.

Las muestras de tejidos fueron introducidas en contenedores estériles o bolsas de plástico individuales, debidamente identificadas y conservadas a -80°C hasta su procesamiento. Cuando el caso de necropsia remitido no tenía diagnóstico definitivo previo pero los hallazgos eran compatibles con parvovirus, se procedió a realizar un test de diagnóstico rápido utilizando contenido intestinal.

Se ha recogido además las siguientes muestras:

- 5 muestras de heces *felinas* procedentes de animales con diarrea con resultado positivo.
- 2 muestras intestinales de dos *hurones* (*Mustela putorius furo*) remitidas para diagnóstico postmortem, desde el Departamento de Anatomía Patológica del HCV (UCM), con resultado positivo.
- 1 muestra de tejido intestinal de un ejemplar de *panda rojo* (*Ailurus fulgens*) remitida con idéntico objetivo, con resultado positivo

3. Evaluación de la sintomatología clínica

La sintomatología clínica presentada por los animales en vida se valoró empleando los siguientes parámetros clínicos:

- Signos sistémicos: escala del 0 al 3, tal y como se detalla en la tabla 1.
- Signos digestivos: escala del 0 al 3 igual que en el caso anterior.
- Mortalidad: escala del 0 al 1, tal y como se refleja en la tabla 1.

Tabla 1: modelo de valoración clínica de los casos origen de la muestra

SINTOMATOLOGÍA CLÍNICA/ MORTALIDAD		
Sistémica	Normal	0
	Depresión	1
	Anorexia	2
	Letargia	3
Digestivos	Normal	0
	Vómitos - gastritis	1
	Diarrea hemorrágica leve	2
	Diarrea hemorrágica incoercible	3
Mortalidad	No	0
	Si	1

Asimismo, se ha evaluado la presentación de otro tipo de sintomatología concomitante a la digestiva y sistémica, valorando la aparición de estos síntomas con escalas de 0-1, tal y como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2: Sintomatología concomitante en animales clínicamente enfermos de parvovirus

OTROS SÍNTOMAS		
Neurológicos	No	0
	Si	1
Respiratorios	No	0
	Si	1

4. Origen y características de las muestras empleadas

Las muestras de heces caninas analizadas en este trabajo proceden de animales que han acudido a consulta, tanto del Hospital Clínico Veterinario Complutense como del Hospital Veterinario Postas (Aranjuez), con sintomatología compatible con parvovirus canino.

Se han recogido además muestras de órganos (cerebro, pulmón, corazón, hígado, intestino y timo) de necropsias de animales remitidos directamente a la sala de

necropsias del Hospital Clínico Veterinario Complutense tanto por el servicio de hospitalización del mismo, como de clínicas particulares.

Las muestras de heces felinas analizadas en este trabajo proceden de consulta del Hospital Clínico Veterinario Complutense así como del Hospital Clínico Veterinario Postas.

Las muestras de tejido intestinal 2 de dos hurones (*Mustela putorius furo*), así como la un ejemplar de panda rojo (*Ailurus fulgens*) fueron remitidas para diagnóstico postmortem, desde el Departamento de Anatomía Patológica del HCV (UCM), con resultado positivo.

5. Líneas celulares:

5.1. *Descongelación de líneas celulares estables*

Se han utilizado CRFK (línea celular generada a partir de corteza renal de gato), y MDCK (línea celular diploide de riñón canino). Las células se mantienen congeladas en un tanque de nitrógeno líquido (N₂L, -196°C), hasta su utilización. Se almacenan en criotubos estériles de 2ml, empleando suero fetal bovino (SFB) con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich), a una concentración de $4 \cdot 10^6$ células /ml.

El proceso de descongelación se llevó a cabo utilizando un baño maría a 37°C, para después suspender las células en 10ml de medio RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen, EEUU), suplementado con 100UI/ml de Penicilina, 100ug/ml de Estreptomicina, 0,25 µg/ml de Anfotericina B (Gibco, EEUU) y un 10% de SFB, depositándolas en un frasco de cultivo de 25 cm² de superficie. Los frascos se mantuvieron en incubación a 37°C en una estufa con atmósfera 5% de CO₂. Transcurridas de 12 a 24 horas postdescongelación el medio de cultivo se renovó para eliminar los restos de DMSO.

5.2. *Cultivo y mantenimiento de la líneas celulares CRFK y MDCK*

El mantenimiento de las líneas celulares se realizó mediante pases seriados en frascos de cultivo de 25 o 75 cm² de superficie.

El medio de cultivo empleado para ambas fue RPMI 1640 (Gibco, EEUU), tamponado con HEPES 25mM y suplementado con L-Glutamina; asimismo se

suplementó con 100UI/ml de Penicilina, 100ug/ml de Estreptomicina, 0,25 µg/ml de Anfotericina B (Gibco, EEUU).

Como medio de crecimiento se empleó RPMI 1640 adicionado con un 10% SFB y como medio de mantenimiento RPMI 1640 con un 2% de SFB.

Se realizaron pases seriados de las células cada 48 horas mediante el desprendimiento del tapiz confluyente con tripsina-EDTA 0,25 % (Gibco, EEUU). Una vez desprendido, se neutralizó la tripsina utilizando medio de mantenimiento, resuspendiendo y dispersando las células en el mismo. Tras este paso se procedió al recuento de las células utilizando una cámara de Thoma y se ajustó la concentración de las mismas en función de la superficie necesitada y los distintos soportes plásticos empleados. Las concentraciones aproximadas para cada soporte fueron:

- Frascos de 25 cm² de superficie: 5 a 6x10⁶ células
- Frascos de 75 cm² de superficie: 15 a 20x10⁶ células
- Placas de 96 pocillos: 10⁴ células / pocillo
- Placas de 12 pocillos: 2x10⁵ células/ pocillo

5.3. Virus empleados.

Para la consecución de los diferentes objetivos se utilizaron 106 muestras-inóculos de Parvovirus de muestras clínicas caninas.

Se han utilizado asimismo 4 vacunas de parvovirus canino como controles positivos:

- Primodog-P, laboratorios Merial, parvovirus canino, virus vivo modificado y atenuada cepa Cornell 7809126, multiplicada en cultivo celular, título antigénico mínimo de log. 10⁶
- Canigen Cachorros 2b, laboratorios Virbac: Parvovirus canino vivo atenuado 2b cepa CPV39, mínimo de 10^{5,6} a 10^{7,5} TCID₅₀.
- Vanguard CPV, laboratorios Pfizer: parvovirus canino, virus vivo atenuado, cepa NL-35-D, mínimo: 10^{7,0} DICC₅₀

- Nobivac parvo 2c, laboratorios Intervet: parvovirus canino, virus atenuado, cepa 154 $\geq 10^7$ TCID₅₀.

Todas las muestras se conservaron a -80º hasta su procesado.

5.4. Producción de virus

La producción de virus se realizó mediante la inoculación de monocapas CRFK y MDCK semiconfluentes de 24 horas postsubcultivo. Tras retirar el medio de crecimiento se añadió una cantidad de inóculo suficiente para obtener una multiplicidad de infección (MOI) entre 0.01 y 0,02. Tras 1-1,5 horas de adsorción a 37ºC en atmósfera de 5% de CO₂ se añadió medio de mantenimiento (RPMI 1640 con un 2% o un 5% de SFB) procediéndose a la observación diaria de los cultivos para la observación de la aparición de efecto citopático (ECP).

Cuando el 80-90% del tapiz presentó ECP, los frascos de cultivo se congelaron a -80ºC. Antes de efectuar nuevos pases de virus, los frascos se sometieron a tres ciclos de congelación-descongelación a temperatura ambiente, con la finalidad de romper las células y liberar al medio la mayor cantidad de virus posible. Posteriormente se centrifugaron a 1800g durante 10-15 minutos a 4ºC a fin de retirar los restos celulares. El sobrenadante se retiró y conservó a -80ºC hasta su posterior utilización.

5.5. Titulación de virus

La titulación de los inóculos víricos obtenidos se realizó por duplicado, empleando placas de 96 pocillos tapizadas con monocapas subconfluentes de 24 horas de células CRFK y MDCK, sembradas a una concentración de 2×10^5 células por pocillo. Se prepararon diluciones seriadas en base 10 desde 10^{-1} a 10^{-8} para cada virus en medio de cultivo sin suero. Cada pocillo se inoculó con 100ul de cada dilución (dos réplicas) y manteniéndose 4 pocillos control por placa con medio de mantenimiento. Tras 1-1,5 horas de adsorción a 37ºC en atmósfera de 5% de CO₂ se añadió medio de mantenimiento (RPMI 1640 con un 2% o un 5% de SFB) procediéndose a la observación diaria de los cultivos para la observación de la aparición de efecto citopático (ECP). La lectura final se realizó a los 4, 5 y 6 postinfección (pi). El cálculo de

virus se realizó utilizando el método de Reed y Muench (1938) expresándose como dosis infectantes 50 de cultivo de tejidos (DI₅₀CT)).

5.6. Obtención, preparación y almacenamiento de las muestras.

Los inóculos para cultivos celulares se preparan a partir de macerados de órganos o de muestras de contenido intestinal-heces:

- Las muestras de heces conservadas a – 80º fueron descongeladas, homogeneizadas en PBS al 10 % y centrifugadas a 2000 rpm durante 10 minutos.
- En el caso de muestras de necropsia, fueron introducidas en contenedores estériles o bolsas de plástico individuales, identificadas y conservadas a -80ºC hasta su procesamiento. Para la preparación de los macerados fueron descongeladas obteniéndose fragmentos de aproximadamente 1 gramo de hígado, bazo, riñón, corazón, cerebro, linfonódulos, intestino delgado y grueso y material fecal. Se mezclaron las muestras con 10 ml de PBS al 10% en una bolsa de Stomacher, procediéndose a su homogeneizado en un mezclador de palas Stomacher® 3500. Esta mezcla se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos.

En ambos casos se tomaron 0.5 ml de sobrenadante, realizando una dilución 1:3 con buffer fosfato salino (PBS). Esta dilución se filtra mediante filtros de 22 micras (Millex® GP Millipore® Express PES Membrane). Se suplementa este filtrado con una solución de antibióticos 3x: mezcla de 100UI/ml de Penicilina, 100ug/ml de Estreptomicina, 0,25 µg/ml de Anfotericina B, o bien una solución 3x de Gentamicina 10mg/ml. Se mantuvieron en contacto durante 15 a 20 minutos a temperatura de laboratorio a fin de eliminar la mayor cantidad posible de contaminantes microbianos. Se almacenaron en tubos estériles de 3ml a -80ºC hasta su utilización para realizar aislamiento vírico.

5.7. Adaptación al crecimiento en las líneas celulares CRFK y MDCK.

La producción de virus se realizó mediante la inoculación de monocapas CRFK y MDCK semiconfluentes de 24 horas postsubcultivo, de modo semejante al procedimiento descrito en el apartado 2.4.1. de producción de inóculos víricos.

Se utilizaron placas de 12 pocillos (2×10^5 células/ml) con un volumen de 2ml/pocillo de RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB. Una vez retirado el medio se inocularon dos réplicas de cada muestra. Tras 1-1,5 horas de adsorción a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ se añadió medio de mantenimiento (RPMI 1640 con un 2% o un 5% de SFB) procediéndose a la observación diaria de los cultivos para la observación de la aparición de efecto citopático (ECP).

Al final de cada periodo de incubación y lectura final (5 o 6 pi) sin observación de efecto citopático, los cultivos se sometían a tres ciclos de congelación-descongelación. Se realizaron tres pases ciegos seriados en células CRFK y MDCK para el aislamiento y la adaptación al crecimiento “in vitro” de las diferentes muestras. Aquellas que presentaron ECP se recolectaron individualmente y no se incluyeron en el siguiente pase. La presencia de efecto citopático se consideró como aislamiento positivo de virus.

6. Identificación de la infección mediante inmunofluorescencia directa.

La inmunofluorescencia directa se utilizó para identificar la presencia de virus en los cultivos celulares CRFK y MDCK inoculados.

Para ello se emplearon placas de 96 pocillos tapizadas (10^4 células / pocillo) como se describe en el apartado anterior, e inoculadas con 100 µl de cada una de las muestras sometidas a aislamiento en pase 3.

Las placas fueron sometidas a tinción entre las 18 a 24 horas postinfección. Para la fijación se empleó alcohol de 70°C con un 1% de ácido acético glacial (Merck) durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Para la tinción se utilizó un conjugado con un anticuerpo monoclonal con isotiocianato de fluoresceína con reacción frente a CPV-2a, CPV-2b y CPV2c y también frente al virus de la Panleucopenia felina y el virus de la Enteritis del visón (210-10-CPV, VMRD).

La presencia de marcaje citoplásmico o nuclear fue considerado como positivo, implicando la presencia de infección sobre los cultivos celulares en las dos líneas empleadas.

7. Identificación de la infección mediante inmunocromatografía:

Se han utilizado los siguientes test comerciales basados en técnicas inmunocromatográficas para la detección del antígeno de parvovirus canino en muestras de heces, siguiendo las instrucciones del fabricante en todos los casos:

- IngezimParvocrom, Inmunología y genética aplicada S.A. (Ingenasa): test basado en la técnica de Inmunocromatografía que utiliza una mezcla de anticuerpos monoclonales específicos frente a CPV, capaces de detectar CPV-2, 2a y 2b.
- Fastest Parvo Card, MegacorDiagnostik: test rápido inmunocromatográfico con 2 anticuerpos monoclonales frente a parvovirus; detecta parvovirus canino, felino y en hurones.
- SensPert CCV Ag/CPV Ag Test Kit. VetAllLaboratories: test inmunocromatográficos para la detección simultánea de antígeno de coronavirus canino (CCV) y parvovirus canino (CPV).
- Minitest CPV/CCV. AllDiaglaboratories: ensayo inmunocromatográfico para la detección del parvovirus canino/coronavirus canino.

8. Identificación de la infección mediante Elisa rápido:

Se ha utilizado asimismo un test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) sándwich rápido, utilizando muestras de heces para la detección del antígeno de parvovirus en las mismas, siguiendo en todo momento las instrucciones del fabricante:

- SNAP Parvo IDEXX laboratorios: inmunoensayo enzimático rápido para detección de antígeno de parvovirus canino en heces de cánidos.

9. Identificación de la infección mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

Se ha realizado como técnica de referencia para la detección del antígeno de parvovirus canino una PCR para las muestras biológicas detalladas en el apartado 4.

9.1. Extracción de DNA para PCR:

Las muestras de heces se homogeneizaron en PBS al 10 % y se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos.

En el caso de muestras de necropsia, se tomaron muestras de aproximadamente 1 cm³ de hígado, bazo, riñón, corazón, cerebro, linfonódulos, intestino delgado y grueso y material fecal. Se mezclaron las muestras con 10 ml de PBS al 10% en una bolsa de Stomacher, procediéndose a su homogeneizado en un mezclador de palas Stomacher® 3500. Esta mezcla se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos.

Se tomaron 300 microlitros del sobrenadante de cada muestra y se mezclaron en un tubo eppendorf de 1 ml de capacidad con 3 microlitros de proteinasa K (Sigma-Aldrich®, Madrid, España) y con 17 microlitros de dithiothreitol (DTT) (Roche Diagnostics®, Barcelona, España), para estimular la actividad de la proteinasa K. La mezcla se introdujo en un baño maría a una temperatura de 45 ° durante 10 minutos.

Se extrajo el DNA de las muestras mediante un sistema de extracción de DNA genómico de tejidos QuickGene –mini80 (Fujifilm®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema se basa en la extracción del DNA mediante tecnología de filtración por presión con membranas porosas patentadas que inmovilizan el ácido nucleico.

9.2. Realización de la PCR convencional:

Para la realización de la PCR convencional se ha utilizado AmpliTaq Gold (AppliedBiosystems, Madrid, España) y la pareja de primers 555for (CAGGAAGATATCCAGAAGGA) y 555rev (GGTGCTAGTTGATATGTAATAACA) (Sigma-Aldrich®, Madrid, España), localizados en la posición 4003-4022 y 4585-4561 del genoma de CPV, respectivamente (Buonavoglia y col, 2001). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 microlitros, conteniendo agua ultrapura, buffer de PCR (KCL 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8.3), MgCl₂ 2mM, 1 microlitro de dNTPs, 1 microlitro de cada primer, 0,25 microlitros de AmpliTaq Gold y 7 microlitros de DNA.

Las condiciones de temperatura consistieron en una activación de la polimerasa AmpliTaq Gold a 94 ° durante 10 minutos, 40 ciclos de desnaturalización a 94° durante 30 segundos, una fase de alineación a 50° C durante 1 minuto, polimerización a 72°C durante 1 minuto seguida de una fase final de extensión a 72° durante 10 minutos. La PCR se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer®).

Los productos de PCR se detectaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y visualización bajo luz ultravioleta utilizando una tinción de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich®), a una concentración final de 0,5 µg/ml. El gel se visualizó en un transiluminador UV y las imágenes se documentaron en un sistema de documentación de imágenes de gel.

Se tomaron como muestras positivas a CPV aquellas en las que apareció una banda de 583 pb correspondiente a la amplificación parcial de VP2 en el gel de electroforesis.

9.3. Purificación y secuenciación de las muestras:

De las muestras positivas a PCR se realizó una selección de muestras para secuenciación en función del año de presentación y grupos de edad de los animales.

Las muestras de PCR seleccionadas se sometieron a un proceso de purificación mediante un Kit de purificación de PCR Minielute® (Qiagen), siguiendo el protocolo

indicado en el kit para la preparación de las muestras. El principio de este sistema de purificación combina unas columnas de centrifugación con las uniones selectivas a una membrana de sílice, proporcionando altas concentraciones finales de fragmentos de DNA purificados. El DNA se adsorbe a la membrana de sílice en presencia de altas concentraciones de sal, mientras que los contaminantes pasan a través de la columna. Las impurezas se eliminan y el DNA puro se eluye con buffer Tris.

Se añaden 250 µl de Buffer PB a 50 µl de reacción de PCR. Tras este paso es necesario comprobar el color de la mezcla, que debe ser amarillo; si es naranja o violeta, es necesario añadir 10 µl de acetato de sodio 3M pH 5. En nuestro caso, todas las reacciones tuvieron el color adecuado, por lo que no fue necesario añadir acetato de sodio.

Se coloca una columna MiniElute en un tubo Eppendorf de 2 ml en una gradilla. Para que el DNA se una a la membrana, se añade la muestra a la columna y se centrifuga 1 minuto a 13000 rpm en una microcentrífuga a temperatura ambiente. Tras este paso, se descarta el filtrado y se coloca de nuevo la columna en el mismo tubo. Se añaden 750 µl de buffer PE a la columna para realizar el lavado, y se centrifuga de nuevo 1 minuto a 13000 rpm. Se descarta el filtrado, volviendo a posicionar la columna en el mismo tubo y se realiza una centrifugación adicional. Se coloca tras esto la columna MiniElute en un tubo limpio de 1,5 ml de microcentrífuga. Para la elución del DNA, se añaden 10 µl de Buffer EB (10 mM Tris-Cl a pH 8.5) al centro de la membrana de la columna. Se mantiene a temperatura ambiente durante 1 minuto y se centrifuga nuevamente a 13000 rpm. El filtrado obtenido es el DNA purificado.

Los productos de PCR así obtenidos y purificados se enviaron a la unidad de genómica de la Universidad Complutense de Madrid, perteneciente al Parque Tecnológico de Madrid, situado en la facultad de Ciencias Biológicas de la UCM.

Las secuencias recibidas por correo electrónico de la unidad de genómica de la UCM se procesaron con el software de análisis de secuencias de DNA Chromas Lite (Technelysium Pty Ltd, Australia). Las secuencias deducidas, en formato FASTA, se

introdujeron en la herramienta MEGA 6 (Molecular Evolutionary genetics Analysis Version 6.0) (Takamura K y col, 2013). La especificidad de las secuencias se determinó utilizando la herramienta Blast (Basic Local Alignment SearchTool) en la base de datos de nucleótidos no redundantes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), confirmando que la muestra procesada corresponde a un parvovirus.

Se obtuvieron secuencias de CPV-2, CPV-2a, 2b y 2c de distintas localizaciones geográficas de la base de datos de nucleótidos del NCBI y se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas en este estudio junto con las secuencias obtenidas de la base de datos mediante el algoritmo Clustal W de la herramienta Mega6.

10. Estudio estadístico:

El análisis estadístico de los datos se realizó con el software de analítica predictiva IBM SPSS Statistics versión 20, para Windows.

Los métodos estadísticos utilizados fueron:

- *Tablas de contingencia:* se emplean para registrar y analizar la relación entre 2 o más variables, habitualmente de naturaleza cualitativa.
- *Coeficiente de Kappa:* permite cuantificar el grado de acuerdo entre 2 pruebas diagnósticas en variables cualitativas. Los resultados de las pruebas se consideran más concordantes cuando el estadístico kappa es más próximo a 1; que no tienen relación cuando el estadístico kappa es 0; y que la concordancia es inversa cuando el estadístico kappa es -1

VI.- RESULTADOS

VI.- Resultados:

1. Selección de muestras:

Se seleccionaron un total de 105 muestras caninas, de las que 101 procedían de perros con sintomatología clínica compatible con parvovirus. Todas ellas se evaluaron con, al menos, un test inmunocromatográfico o ELISA (screening), resultando 100 animales positivos y 1 negativo. Las 4 muestras caninas restantes pertenecían a animales asintomáticos, a fin de formar parte de un grupo control negativo, y se evaluaron de idéntica forma con al menos un test inmunocromatográfico o ELISA, con resultado negativo.

Durante el curso del estudio se evaluaron además:

- 5 muestras de heces *felinas* procedentes de animales con diarrea con resultado positivo.
- 2 muestras intestinales de dos *hurones* (*Mustela putorius furo*) remitidas para diagnóstico postmortem, desde el Departamento de Anatomía Patológica del HCV (UCM), con resultado positivo.
- 1 muestra de tejido intestinal de un ejemplar de *panda rojo* (*Ailurus fulgens*) remitida con idéntico objetivo, con resultado positivo.

En total se seleccionaron 108 muestras positivas (screening) de diferentes especies animales: 100 caninas, 5 felinas, 2 mustélidos y un aleiurido. Se incluyeron también las 5 muestras caninas clasificadas en un primer screening como negativas (4 animales asintomáticos y uno con sintomatología compatible con parvovirus). El periodo de estudio abarcó desde el año 2004 hasta 2013, ambos inclusive. Debido a las características retrospectivas de algunas partes del estudio, hay datos que no se encuentran disponibles en determinados casos.

En la tabla nº 3 se detalla el nº de casos positivos en el screening inicial, pertenecientes a la especie canina, agrupados por año.

Tabla 3: muestras caninas positivas agrupadas por año.

año	Nº muestras
2004	6
2005	5
2006	8
2007	18
2008	15
2009	23
2010	10
2011	4
2012	6
2013	5
total	100

Todos los casos caninos seleccionados (tanto positivos como negativos en el screening inicial), correspondieron tanto a muestras procesadas “in vivo” (heces y contenido intestinal), procedentes de consulta o de animales hospitalizados, como a muestras de tejidos/órganos remitidas “postmortem” por el Servicio de Anatomía Patológica del HCV. El desglose y número de cada tipo de muestra se detalla en la tabla número 4:

Tabla 4: tipo de muestras procesadas

Tipo de muestra	Nº
Heces	54
Órganos	51
Total	105

2. Pruebas de screening para la identificación de la infección mediante inmunocromatografía y/o ELISA rápido:

Para el diagnóstico de parvovirus se han testado todas las muestras con, al menos, un kit comercial, obteniendo un resultado positivo en alguno de los test en 100 de las muestras caninas seleccionadas con sintomatología compatible con parvovirus (tabla 5), es decir, un 97,23 % de las muestras son positivas a uno de los test utilizados directamente en consulta.

Tabla 5: resultados de los test comerciales empleados

	Minitest CPV/CCV ag	Senspert CCV/CPV ag	Fast test parvo card	Idexx	Ingenasa
Número de test positivos	38	34	20	68	71
Numero de test negativos	4	8	22	8	7
Total	42	42	42	76	78

3. Estudio comparativo de diferentes test inmunocromatográficos comerciales y/o ELISA rápido:

Para verificar la sensibilidad diagnóstica y elegir un test diagnóstico que sirviera de base para la clasificación (screening) del banco de muestras de nuestro estudio, se realizó previamente un ensayo comparativo.

Se emplearon cinco kits comerciales: tres monovalentes (sólo parvovirus canino (CPV)) y otros dos test dobles para detección de parvovirus canino (CPV) y coronavirus entérico canino (CCV). Las referencias son:

- Monovalente Parvovirus : SNAP (IDEXX laboratorios)
- Monovalente Parvovirus: Ingezim Parvocrom, Inmunología y genética aplicada S.A. (Ingenasa)
- Monovalente Parvovirus: Fastest PARVO card (Megacor diagnostik),

- Test doble : Minitest CPV / CCV Ag (All Diag)
- Test doble: SensPERT CCV Ag / CPV Ag (VetAll Laboratories).

Los test se ensayaron sobre una muestra aleatoria de 42 heces, procedentes del Servicio de Microbiología y Parasitología (SERMIPA) del HCV de la UCM y del Hospital Veterinario Postas. Todos fueron casos compatibles con Parvovirus en animales con edades comprendidas entre 1,5 y 12 meses edad. Los animales se presentaron en consulta una sintomatología variable desde vómitos aislados hasta gastroenteritis hemorrágica sobreaguda. La muestra temporal abarcó un periodo entre los años 2004 y 2009.

De las 42 muestras procesadas:

- 41 muestras resultaron positivas frente a, al menos, uno de los 4 tests comerciales comparados (figura 1).
- 1 muestra resultó negativa frente a los 4 test empleado

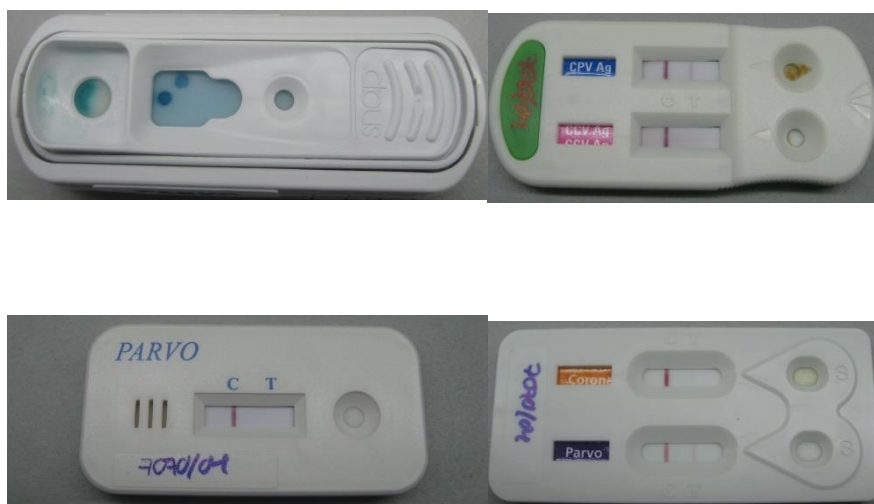


figura 4: algunos de los test comerciales empleados

De las 41 muestras positivas a CPV, 16 de ellas fueron positivas a los 5 test realizados, existiendo diferencias en el resto de las muestras en los distintos kits.

Se compararon los distintos kits entre sí mediante tablas de contingencia, mediante el programa estadístico Winepiscopo, con un nivel de confianza del 95 %, obteniéndose los siguientes valores del estadístico kappa:

- Comparación entre Ingezim Parvocrom (Ingenasa) y SNAP test: kappa = 0.978; concordancia buena.
- Comparación entre Ingenasa y Minitest CPV/CCV: kappa = 0.876; concordancia muy buena.
- Comparación entre Ingenasa y SensPERT CCV Ag/CPV Ag: kappa = 0.876; concordancia muy buena.
- Comparación entre Ingenasa y Fastest PARVO card: kappa = 0.480; concordancia moderada.
- Comparación entre SNAP test frente a Fastest PARVO card: kappa = 0'34; concordancia débil
- Comparación entre SNAP test y Minitest CPV/CCV Ag: kappa = 0'7; concordancia buena
- Comparación entre SNAP test y SensPERT CCV Ag /CPV Ag test kit: kappa = 0'58; concordancia moderada.
- Comparación entre Minitest CPV/CCV Ag y SensPERT CCV Ag/CPV Ag test kit: kappa = 0'84; concordancia muy Buena.
- Comparación entre Minitest CPV/CCV Ag y Fastest PARVO card: kappa = 0'39; concordancia débil
- Comparación entre SensPERT CCV Ag/CPV Ag test kit y Fastest PARVO card: kappa = 0'43; concordancia moderada.

Los resultados obtenidos tanto por inmunocromatografía como por ELISA sándwich rápido se han comparado con la técnica laboratorial de referencia (Gold estándar), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), siendo las 41 muestras positivas a esta técnica.

Se añadió posteriormente al estudio otro test monovalente (Ingenasa) , calculando tanto la sensibilidad como la especificidad de los 5 tests, empleando como técnica de referencia la PCR. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: sensibilidad y especificidad de los test rápidos empleados para el diagnóstico de CPV

	Minitest CPV/CCV ag	Senspert CCV/CPV ag	Fast test parvo card	Idexx	Ingenasa
Sensibilidad	90,5	81	47,6	85,7	95,2
Especificidad	100	100	100	100	100

4. Aislamiento vírico en cultivos celulares e identificación de la infección mediante inmunofluorescencia indirecta:

La replicación de las cepas de CPV2 presentes en este estudio se puso en evidencia mediante su inoculación en cultivos celulares CRFK y MDCK, presentando efecto citopático antes de los 6 días post-infección en todos las muestras en las que se había obtenido un resultado positivo en, al menos, un test cromatográfico, exceptuando las muestras 65 y 110 en los que no se encontraron signos de infección.

Mediante inmunofluorescencia indirecta se evidenció la presencia de virus en todas las muestras positivas en, al menos un test cromatográfico, exceptuando, como en el caso anterior, el caso de las muestras 65 y 110 en el que no se observó presencia de infección. Se consideró como positivo la presencia de marcaje citoplásmico o nuclear, implicando la presencia de infección sobre los cultivos celulares en las dos líneas empleadas (figura 5).

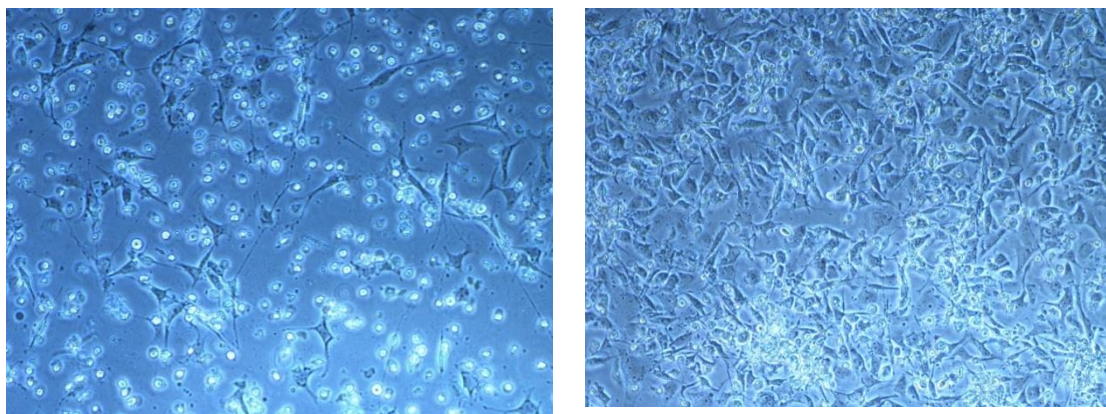
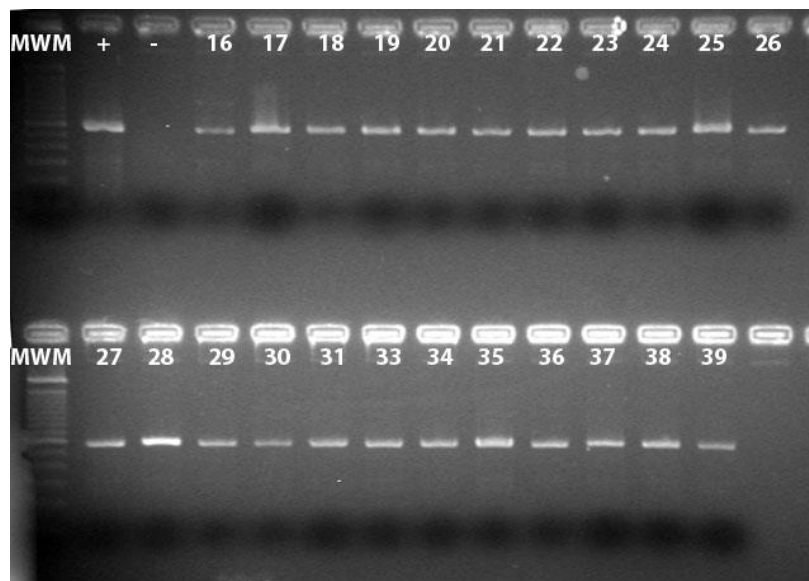
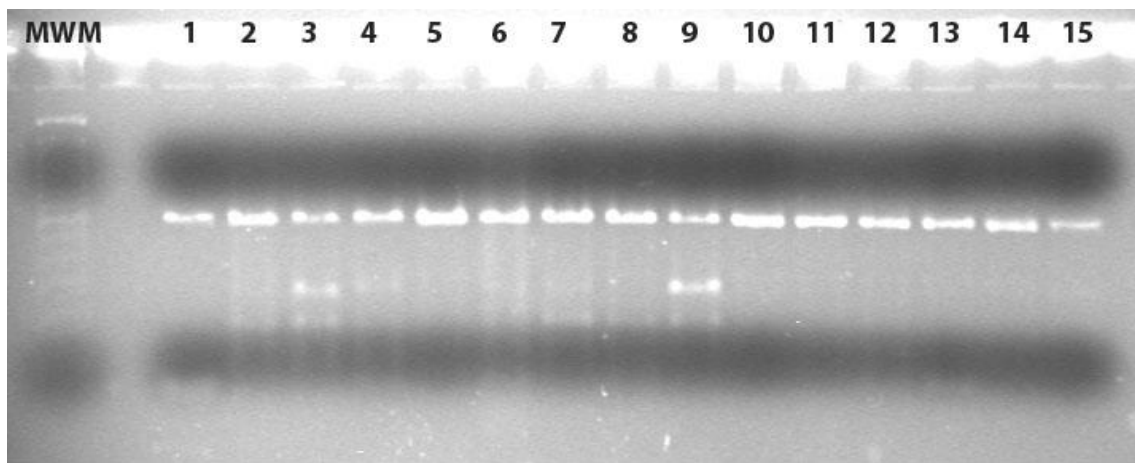
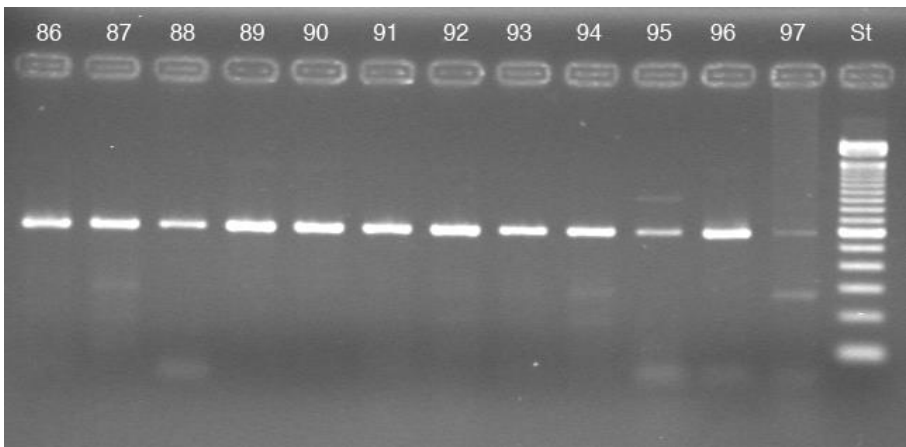
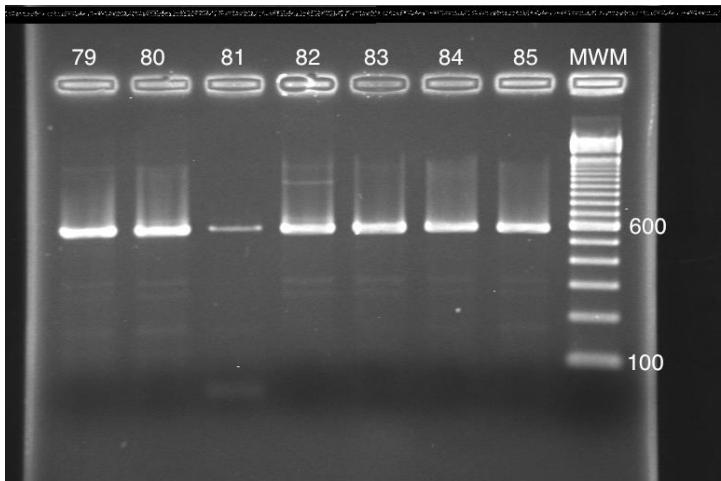
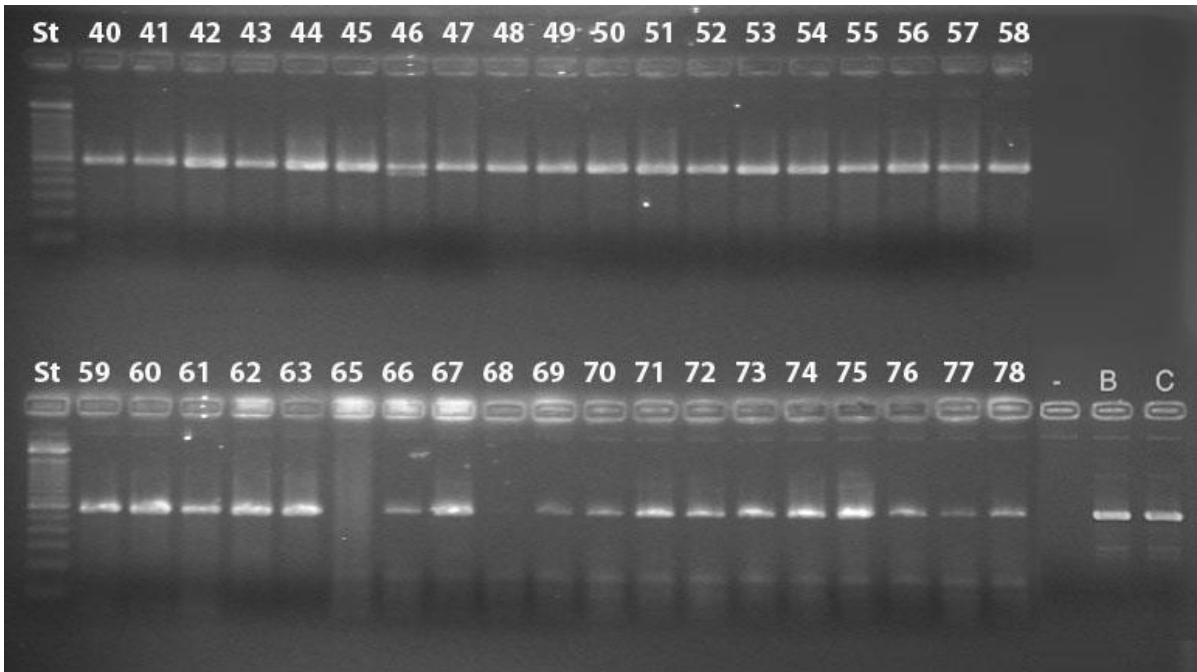


figura 5: cultivos celulares MDCK (izquierdo) y CRFK (derecho), con marcaje citoplásmico y nuclear en inmunofluorescencia indirecta

5. Reacción en cadena de la polimerasa:

Se realizó una PCR con las 113 muestras seleccionadas (105 de procedencia canina, 5 felinas, 2 muestra procedente de un hurón y la restante de un panda rojo) y una posterior electroforesis en gel de agarosa. Dentro de las 105 muestras caninas, se han incluido, además de los controles negativos pertinentes, 3 muestras de animales con sintomatología clínica de parvovirus pero con resultados en test inmunocromatográficos/ELISA negativo. Los resultados de la PCR se muestran a continuación en la figuras 6:





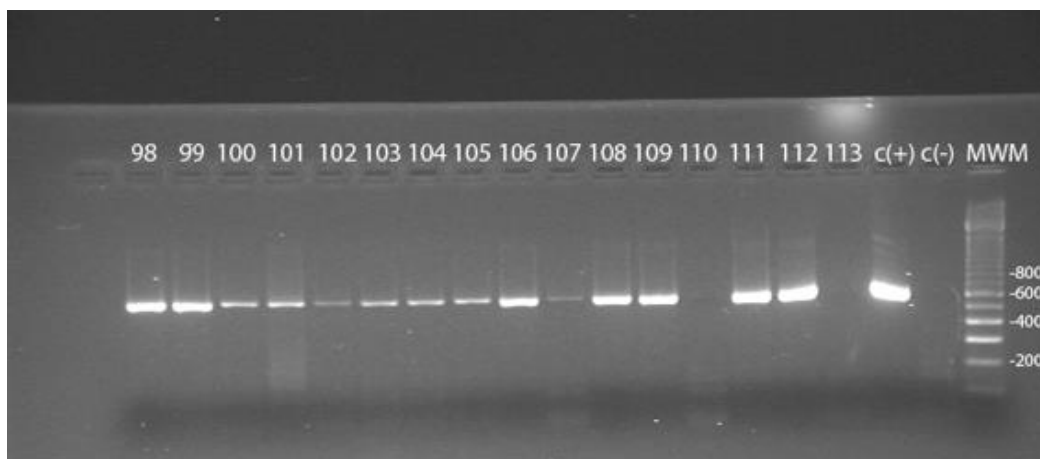


figura 6: resultados de la PCR

De las 113 muestras totales analizadas:

- 108 muestras pertenecen a animales con sintomatología compatible con parvovirus, con, al menos, un resultado positivo en test rápido, (100 perros, 5 gatos, 2 hurones y 1 panda rojo). De ellas, 105 han obtenido un resultado positivo en PCR, es decir, el 97.2 % de las muestras de animales con sintomatología compatible con CPV y con, al menos, un resultado positivo en test rápido, han resultado positivas por PCR.
- Muestras de procedencia canina:
 - De los 101 perros con sintomatología compatible con CPV, 98 han resultado positivos a PCR.
 - En cuanto a las 4 muestras de animales asintomáticos, las 4 han resultado positivas a PCR.
- Muestras de procedencia felina: de los 5 animales con sintomatología compatible con panleucopenia felina y con resultado positivo en un test rápido, 4 de ellos han resultado positivos a PCR.
- Muestras de otras especies: tanto las 2 muestras procedentes de hurones como la del panda rojo han resultado positivas a PCR.

6. Análisis de resultados positivos a test inmunocromatográfico con respecto al gold estándar (PCR):

De las 100 muestras caninas analizadas de animales con sintomatología compatible con CPV y positivas a, al menos, un test rápido, 98 han resultado positivas a PCR, y han sido positivas al menos a un test inmunocromatográfico, utilizándose como test principal el test Ingenasa. Se ha calculado una sensibilidad para dicho test del 92 %, según los resultados obtenidos en este estudio (figura 7).

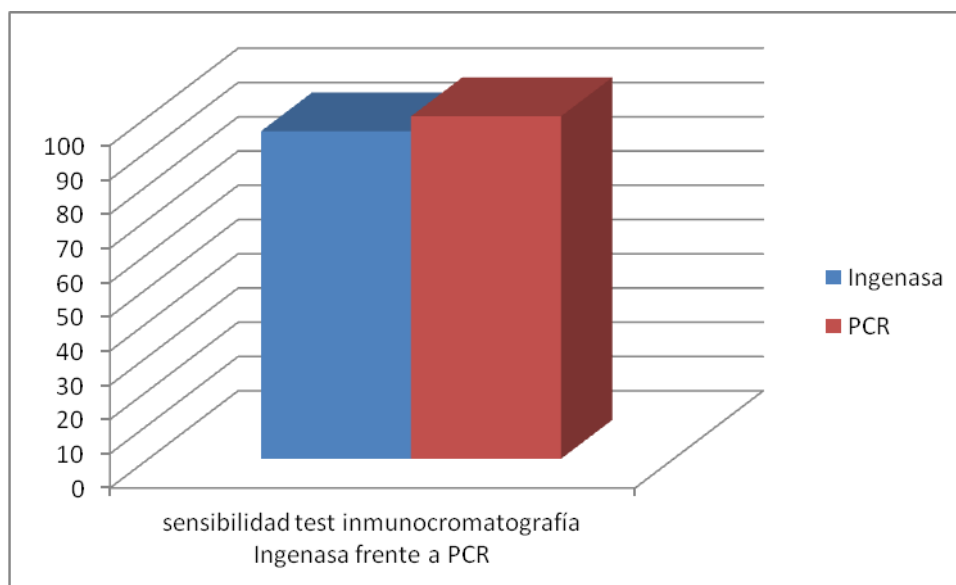


figura 7: sensibilidad del test inmunocromatográfico Ingezim parvocrom (Ingenasa) frente a PCR.

7. Comparación de resultados entre la técnica de referencia (PCR) y distintos test inmunocromatográficos y ELISA:

Del total de muestras del estudio, se han seleccionado un total de 42 muestras de heces caninas positivas a CPV por PCR, aleatoriamente, en las que se ha realizado una comparativa entre distintos test inmunocromatográficos y ELISA frente a PCR.

De las 42 muestras seleccionadas, el 100 % son positivas a PCR. Con respecto a la sensibilidad de los distintos test frente a la técnica de referencia, los resultados son los siguientes (figura 8):

- Inmunocromatografía:

- Ingezim Parvocrom, Inmunología y genética aplicada S.A. (Ingenasa): sensibilidad del 95,2%.
- Fastest Parvo Card, Megacor Diagnostik: sensibilidad del 47,2 %.
- SensPert CCV Ag/CPV Ag Test Kit. VetAll Laboratories: sensibilidad del 81 %.
- Minitest CPV/CCV. Alldiag laboratories: sensibilidad del 90,5 %.
- Elisa rápido:
 - SNAP Parvo IDEXX laboratorios: sensibilidad del 85,7 %.

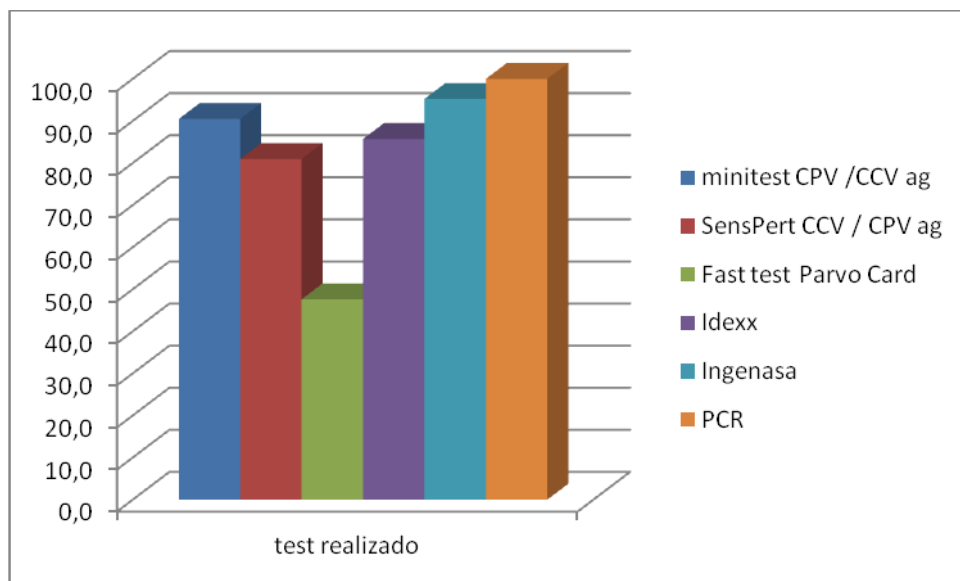


figura 8: sensibilidad de los test rápidos en relacion a la PCR

Los resultados de los distintos test se muestran en la tabla 7.

Tabla 7: resultados de los distintos test rápidos y de la PCR

nº PCR	Minitest CPV /CCV ag	SensPert CCV / CPV ag	Fast test Parvo Card	Idexx	Ingenasa	PCR
1	CPV + / CCV -	CPV + / CCV +	CPV +	CPV +	CPV +	+
2	CPV + / CCV -	CPV - / CCV -	CPV -	CPV +	CPV +	+
3	CPV + / CCV -	CPV - / CCV -	CPV -	CPV +	CPV +	+
4	CPV - / CCV -	CPV - /CCV -	CPV -	CPV +	CPV +	+
5	CPV - / CCV +	CPV + / CCV +	CPV +	CPV -	CPV +	+
7	CPV + / CCV -	CPV + / CCV -	CPV -	CPV +	CPV +	+
8	CPV + / CCV -	CPV + / CCV -	CPV -	CPV -	CPV +	+
13	CPV + / CCV +	CPV + / CCV +	CPV +	CPV +	CPV +	+
16	CPV + / CCV -	CPV + / CCV -	CPV +	CPV +	CPV +	+
17	CPV + / CCV +	CPV + / CCV +	CPV -	CPV -	CPV +	+
20	CPV + / CCV -	CPV + / CCV -	CPV +	CPV +	CPV +	+
25	CPV + / CCV +	CPV + / CCV +	CPV +	CPV +	CPV +	+
26	CPV + / CCV -	CPV + / CCV +	CPV -	CPV +	CPV -	+
29	CPV + / CCV -	CPV + / CCV -	CPV +	CPV +	CPV +	+
30	CPV + / CCV +	CPV + / CCV +	CPV +	CPV +	CPV +	+
31	CPV + / CCV +	CPV + / CCV +	CPV +	CPV +	CPV +	+
32	CPV + / CCV +	CPV + / CCV +	CPV +	CPV +	CPV +	+
35	CPV + / CCV -	CPV + / CCV -	CPV +	CPV -	CPV +	+
38	CPV + / CCV +	CPV + / CCV +	CPV -	CPV +	CPV +	+
40	CPV + / CCV -	CPV + / CCV -	CPV +	CPV +	CPV +	+
42	CPV + / CCV -	CPV + / CCV -	CPV +	CPV +	CPV +	+
43	CPV + / CCV -	CPV + / CCV -	CPV -	CPV +	CPV +	+
44	CPV + / CCV -	CPV + / CCV -	CPV -	CPV +	CPV +	+
45	CPV + / CCV -	CPV + / CCV +	CPV -	CPV +	CPV +	+
46	CPV + / CCV -	CPV - / CCV -	CPV -	CPV +	CPV +	+

48	CPV + / CCV +	CPV +/CCV -	CPV -	CPV +	CPV +	+
49	CPV + / CCV -	CPV +/CCV +	CPV +	CPV +	CPV +	+
50	CPV +/CCV -	CPV +/CCV -	CPV -	CPV +	CPV +	+
51	CPV - / CCV +	CPV - / CCV +	CPV -	CPV +	CPV +	+
54	CPV - / CCV -	CPV - / CCV -	CPV -	CPV -	CPV +	+
55	CPV + / CCV +	CPV - / CCV -	CPV +	CPV +	CPV +	+
56	CPV + / CCV -	CPV + / CCV +	CPV +	CPV +	CPV +	+
57	CPV + / CCV +	CPV - / CCV +	CPV +	CPV +	CPV +	+
58	CPV + / CCV -	CPV + / CCV +	CPV -	CPV +	CPV +	+
59	CPV + / CCV -	CPV + / CCV +	CPV -	CPV -	CPV +	+
66	CPV + / CCV -	CPV + / CCV -	CPV +	CPV +	CPV +	+
67	CPV + / CCV -	CPV + / CCV -	CPV +	CPV +	CPV +	+
69	CPV + / CCV +	CPV + / CCV +	CPV -	CPV +	CPV +	+
71	CPV + / CCV -	CPV + / CCV +	CPV -	CPV +	CPV +	+
72	CPV + / CCV +	CPV + / CCV -	CPV +	CPV +	CPV +	+
77	CPV + / CCV -	CPV + / CCV -	CPV -	CPV +	CPV +	+
86	CPV + / CCV -	CPV + / CCV -	CPV -	CPV +	CPV -	+

8. Caracterización del virus presente en las muestras:

Mediante PCR se obtuvo el amplicón aproximadamente 583 pb del gen de la proteína VP2 de CPV-2 en las 105 muestras caninas analizadas.

Los productos de PCR obtenidos, purificados y seleccionados de 48 muestras caninas se enviaron, junto con los primers directo e inverso antes descrito, a la unidad de genómica de la Universidad Complutense de Madrid, perteneciente al Parque Tecnológico de Madrid, situado en la facultad de Ciencias Biológicas de la UCM. De todas las muestras enviadas, se pudieron secuenciar 41 muestras, existiendo una concentración de ADN insuficiente en las muestras restantes como para ser secuenciado.

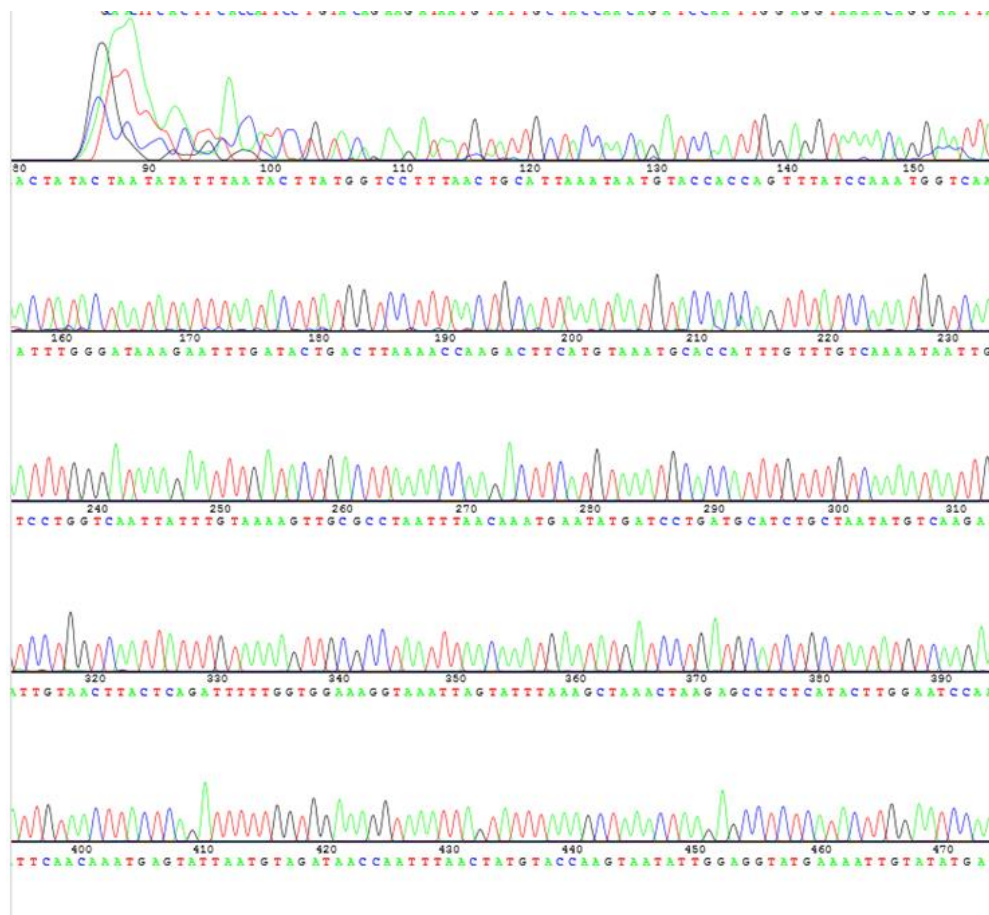
Las muestras caninas seleccionadas aleatoriamente y finalmente secuenciadas, desde 2004 hasta 2013 se muestran en la tabla 8:

Tabla 8: muestras seleccionadas para secuenciación

nº referencia muestra	nº referencia muestra
CPV01_C01_2004	CPV62_C35_2005
CPV02_C02_2006	CPV66_P29_2008
CPV03_C03_2004	CPV71_P33_2008
CPV07_C07_2006	CPV78_C42_2006
CPV08_C08_2005	CPV81_P37_2011
CPV09_C09_2010	CPV83_P51_2011
CPV11_P02_2009	CPV84_P38_2010
CPV12_P03_2010	CPV85_P39_2011
CPV14_P05_2009	CPV86_P40_2011
CPV16_P06_2009	CPV89_C47_2010
CPV23_P13_2009	CPV90_C48_2010
CPV29_P19_2008	CPV91_C49_2009
CPV30_P20_2009	CPV93_C51_2012
CPV33_P23_2010	CPV95_P41_2012
CPV38_C12_2007	CPV96_C54_2005
CPV40_C13_2004	CPV99_P43_2013
CPV46_C19_2007	CPV100_P44_2013
CPV52_C25_2004	CPV102_P45_2013
CPV54_C27_2008	CPV105_P48_2013
CPV56_C29_2004	CPV107_P50_2013
CPV59_C32_2005	

Las 41 secuencias caninas (directas e inversas) recibidas por correo electrónico de la unidad de genómica de la UCM se procesaron con el software de análisis de secuencias de DNA Chromas Lite (Technelysium Pty Ltd, Australia), obteniéndose tanto la secuencia en formato FASTA como el cromatograma correspondiente, tal y como se muestra en la figura 9:.

figura 9: ejemplo de cromatograma correspondiente a una de las muestras secuenciadas



Las secuencias deducidas, en formato FASTA, se introdujeron en la herramienta MEGA 6 (Molecular Evolutionary genetics Analysis Version 6.0) (Takamura K y col, 2013) Se realizó un Mega Blast en la base de datos de nucleótidos no redundantes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) para confirmar que la secuencia procesada corresponde a un parvovirus (canino o felino).

Se obtuvieron secuencias de CPV-2, CPV-2a, 2b y 2c y FPLV de distintas localizaciones geográficas de la base de datos de nucleótidos del NCBI. Las secuencias

de nucleótidos fueron traducidas en aminoácidos mediante el programa de traducción Expsy. Se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas en este estudio junto con las secuencias obtenidas de la base de datos mediante el algoritmo Clustal W de la herramienta Mega6 (figura 10)

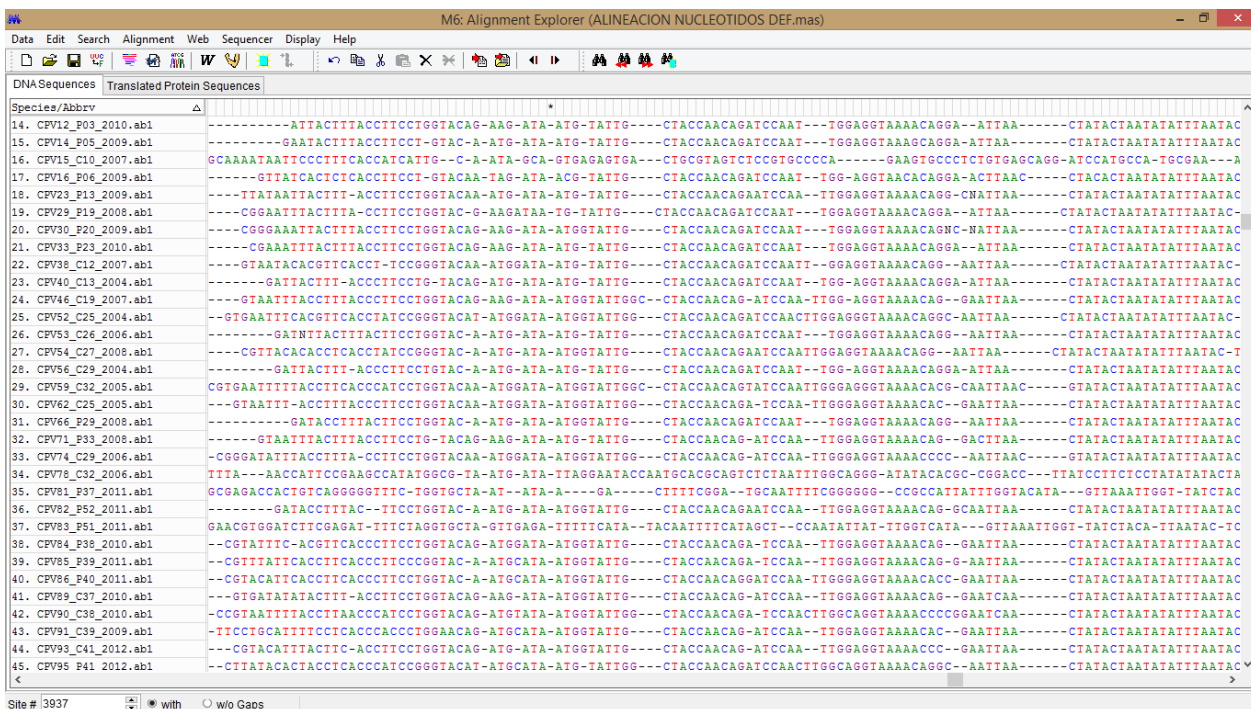


figura 10: ejemplo de alineamiento múltiple de la secuencias obtenidas meditante el algoritmo Clustal W de la herramienta Mega 6

Las secuencias de nucleótidos alineadas fueron traducidas a aminoácidos mediante la herramienta Mega 6. Se han estudiado mutaciones en aminoácidos en las posiciones 426, 440 y 550 y sus aminoácidos colindantes. El residuo 426 está involucrado en las principales mutaciones antigénicas. Todas estas mutaciones se han comparado con las secuencias tipo.

La variante CPV2a difiere de la variante CPV 2 original en cambios aminoacídicos en los residuos 87 (Met → leu), 101 (Ile → Thr), 300 (Ala → Gly), 305 (Asp → Tyr) y 555 (Val → Ile) en los genes que codifican la proteína VP2 de la cápside (Parrish y col., 1991; Mochizuki y col, 1996; Truyen y col., 1996; Phromnoi y col., 2010). La variante CPV 2 b presenta 2 sustituciones, en el residuo 426 (Asn → Asp), y en el

555 (Ile → Val), comparándolo con el tipo 2a. La variante antigénica CPV-2c presenta una sustitución en el residuo 426 (Asp → Glu).

Las muestras caninas incluidas en el presente estudio se han clasificado como CPV-2a, 2b, 2c, FLPV y otras mutaciones según los criterios anteriormente descritos, obteniéndose los siguientes resultados:

- CPV-2a: 15 de las muestras secuenciadas pertenecen a esta cepa (Tabla 9)
- CPV-2b: 7 de las muestras secuenciadas pertenecen a esta cepa (Tabla 10).
- CPV-2c: 12 de las muestras secuenciadas pertenecen a esta cepa (tabla 11).
- FLPV: 2 de las muestras caninas secuenciadas pertenecen a esta cepa (tabla 12).
- Otras mutaciones en la posición 426 (Tabla 13): 4 de las muestras presentan variaciones en la posición 426 no descritas hasta ahora:
 - Tyr426: 2 muestras.
 - His426: 1 muestra.
 - Ser426: 1 muestra.

Tabla 9: CPV-2a

Año	Edad	sexo	raza	vacunación	sintomatología	muerte	Enf. concomitantes
2004	1,5 m	m	bichón maltés	Parcial	gastroenteritis	si	No
2006	4 m	m	bulldog francés	parcial	muerte súbita	si	No
2005	3'5 m	h	yorkshire terrier	completa	desconocida	si	No
2009	7 m	m	bretón	completa	gastroenteritis y signos neurológicos	no	No
2009	3 m	m	golden retriever	no	gastroenteritis hemorrágica	no	No
2009	10m	m	bulldog francés	parcial	desconocida	no	No
2007	1,5 m	h	bulldog francés	no	gastroenteritis	si	No
2008	3,5 m	h	Schnauzer mini	completa	gastroenteritis	si	No
2004	2'5 m	m	yorkshire terrier	parcial	hipoglucemias	si	No
2005	2 m	h	yorkshire terrier	parcial	gastroenteritis leve	si	No
2005	2'5 m	m	yorkshire terrier	no	diarrea	si	No
2008	1 a	m	bóxer	parcial	gastroenteritis fulminante	si	No
2006	2 m	h	chihuahua	no	gastroenteritis hemorrágica	si	No
2006	9 m	h	Pastor alemán	completa	bronconeumonía, vómitos	si	No
2011	9m	m	pinscher	completa	gastroenteritis	si	No

Tabla 10: CPV-2b

Año	Edad	sexo	raza	vacunación	sintomatología	Muerte	Enf. concomitantes
2006	2 m	h	pinscher	parcial	gastroenteritis	Si	No
2010	3m	h	WHWT	no	desconocida	Si	No
2004	2'5 m	h	shitzu	no	gastroenteritis	Si	No
2010	11m	h	braco Weimar	completa	gastroenteritis, hematuria	Si	No
2010	2a	h	pinscher	no	gastroenteritis	Si	No
2009	6m	h	mestizo	no	diarrea	Si	Clostridiosis
2012	1a	m	yorkshire terrier	no	gastroenteritis, neumonía	si	No

Tabla 11: CPV-2c

Año	Edad	sexo	raza	vacunación	sintomatología	muerte	Enf. Concomitantes
2004	2,5 m	m	carlino	No	gastroenteritis	si	moquillo
2009	4m	h	cocker	completa	gastroenteritis hemorrágica	no	no
2010	10a	h	Rottweiler	completa	gastroenteritis hemorrágica, convulsiones	si	no
2008	5 m	m	teckel	parcial	gastroenteritis hemorrágica fulminante	si	no
2009	3 m	h	teckel	parcial	gastroenteritis hemorrágica	no	no
2010	8 m	h	golden retriever	completa	gastroenteritis hemorrágica	si	fallo inmunidad
2007	3 m	h	labrador	no	gastroenteritis hemorrágica, síntomas respiratorios	si	no
2008	5m	m	galgo	no	gastroenteritis	no	no
2010	3a	h	bulldog ingles	no	gastroenteritis fulminante	si	no
2013	1a	m	mastín	no	gastroenteritis hemorrágica	Si	No
2013	8 m	h	shitzu	completa	gastroenteritis hemorrágica	No	No
2013	7a	h	setter inglés	completa	gastroenteritis hemorrágica	No	No

Tabla 12: FLPV

Año	Edad	sexo	raza	vacunación	sintomatología	Muerte	Enfermedades concomitantes
2011	8 m	m	Pastor Alemán	completa	gastroenteritis	No	No
2011	7a	h	mestizo grande	completa	gastroenteritis	si	no

Tabla 13: otras mutaciones

Mutación	Año	Edad	sexo	raza	vacunación	sintomatología	Muerte	Enf. Concomitantes
426								
TAT	2004	2'5 m	h	schнауzer	completa	gastroenteritis leve	Si	Moquillo
TAT	2012	9a	h	mestizo	completa	asintomática	No	No
CAT	2005	2,5 m	m	presa canario	parcial	vómitos y diarrea	No	No
AGT	2011	3a	m	golden retriever	completa	asintomático	No	no

9. Descripción estadística de la población enferma.

Se ha recogido en este apartado la información de los animales de la especie canina con signos clínicos compatibles con CPV incluidos en estudio. Debido a las características retrospectivas del estudio, no fue posible en todos los casos, disponer de toda la información necesaria para cada una de las variables analizadas.

Como se ha descrito anteriormente, se han incluido en este estudio 101 muestras de animales de especie canina con signos clínicos compatibles con CPV y con un resultado positivo en, al menos, un test cromatográfico.

9.1. Edad

En cuanto a los rangos de edad, el 39 % de animales son menores de 2 meses (tabla 1), el 34 % se encuentran entre 2'1 y 4 meses, el 12 % entre 4'1 y 9 meses y el 14% de animales son mayores de 9 meses, tal y como aparece en la tabla 3 y en la figura 3. Hay un 2 % de animales de los que se desconocen los datos en lo referente a su edad (figura 11 y tabla 14).

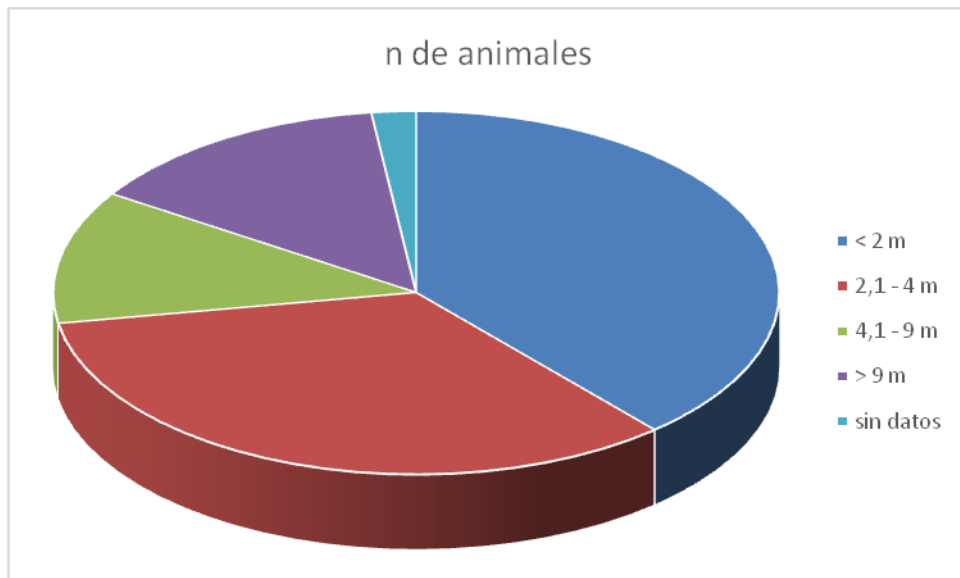


figura 11: clasificación de los animales según rangos de edad

Tabla 14: clasificación de los animales según rangos de edad

edad	N animales	%
< 2 m	39	39%
2,1 - 4 m	34	34%
4,1 - 9 m	12	12%
> 9 m	14	14%
sin datos	2	2%
total	101	100,0

9.2. Sexo

En cuanto a la predisposición del animal a padecer CPV según el sexo, en este estudio, el 49 % de animales son machos y el 51 % hembras, tal y como se indica en la tabla 15 y en la figura 12.

Tabla 15: distribución de la población de perros con CPV según el sexo

Sexo	N	%
Machos	49	48.5
Hembras	52	51.5

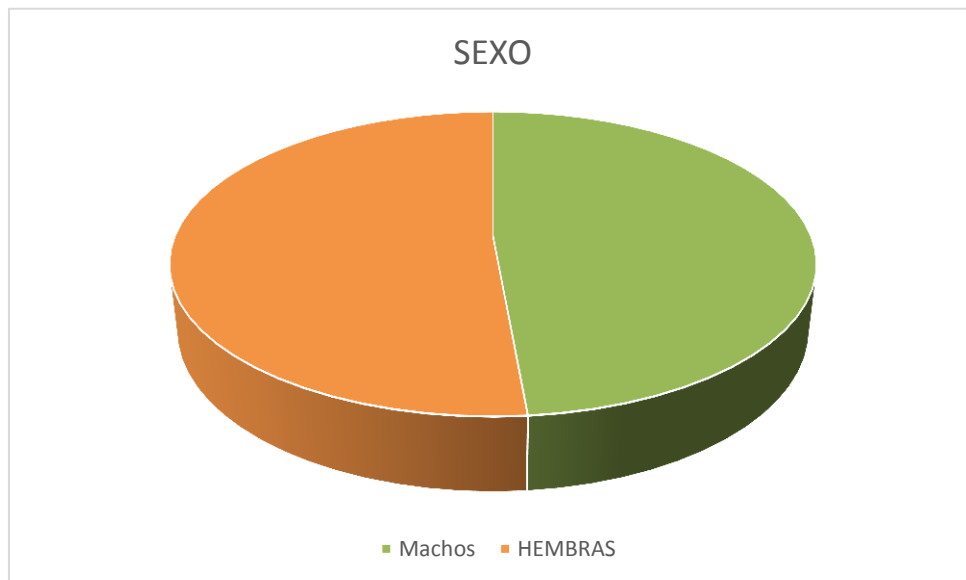


figura 12: distribución de la población canina con CPV según el sexo

9.3. Raza

Debido a la existencia de una gran variedad racial, se han establecido 5 grupos según el peso medio adulto de la raza (tabla 16):

Tabla 16: clasificación de las razas según su peso medio adulto

Tipo	Peso medio adulto	Razas
Miniatura	< 5 kg	Pinscher, Bichón Maltés, Chihuahua, Yorkshire Terrier, Shitzu.
Pequeño	5,1-10 kg	Carlino, West Highland White terrier, mestizos pequeños, Schnauzer, Teckel, Bulldog francés, caniche
Mediano	10,1 – 30 kg	Galgo, Cocker Spaniel, Breton, Golden Retriever, Pitbull, Boxer, Labrador Retriever, Setter Irlandés, Bulldog ingles, SharPei, Border Collie, Presa canario
Grande	30,1-50 kg	Rottweiler, Pastor Alemán, Braco de Weimar.
Gigante	> 50 kg	Mastín

Realizada esta clasificación, se observa que el 26% de los animales son de raza miniatura, el 35 % de raza pequeña, el 31 % de raza mediana y el 5 % de raza grande (Figura 13 y Tabla 17).

Tabla 17: distribución de la población canina con CPV en función de la raza

Raza	n	%
mini	27	27%
pequeña	36	36%
mediana	30	30%
grande	5	5%
gigante	1	0%
sin datos	2	2%
total	101	100,0

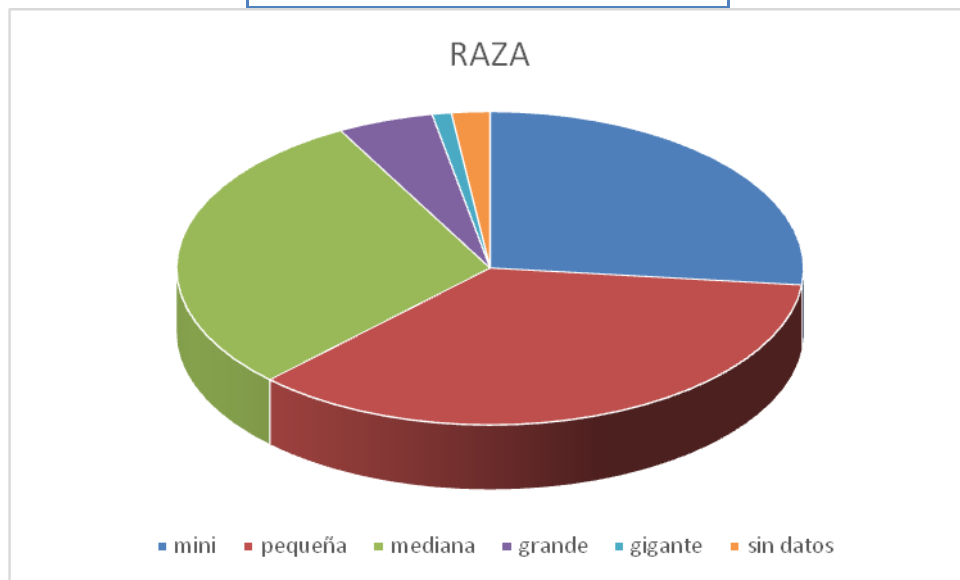


figura 13: distribución de la población canina con CPV en función de la raza

9.4. Estado de vacunación frente a CPV:

Con respecto a si los animales enfermos clínicamente y diagnosticados como positivos a infección por CPV se encontraban vacunados o no, el 50 % de los animales de este estudio se encontraban correctamente vacunados o parcialmente inmunizados con al menos una dosis de vacuna durante la primovacuna. Los animales se valoraron del en una escala del 0 al 2 según el siguiente criterio (tabla 18):

Tabla 18: estado de vacunación frente a CPV según la edad

Estado de vacunación		
Animales menores de 12 meses	No vacunado	0
	Primovacunación incompleta	1
	Primovacunación completa	2
Animales mayores de 12 meses	No vacunado	0
	Primovacunación y/o revacunación incompleta	1
	Primovacunación y revacunación completa	2

Según esta clasificación, el 34 % de los perros incluidos en este estudio se encontraba parcialmente vacunado, el 23% se encontraba totalmente vacunado, el 36 % no disponía de ninguna dosis vacunal y del 7% de los animales no se dispone de datos (figura 19 y tabla 14)

Tabla 19: clasificación de la población canina con CPV en función de su estado de vacunación

Vacunación				
parcial	completa	No	sin datos	total
36	20	38	7	101
34%	23%	36%	7%	100%

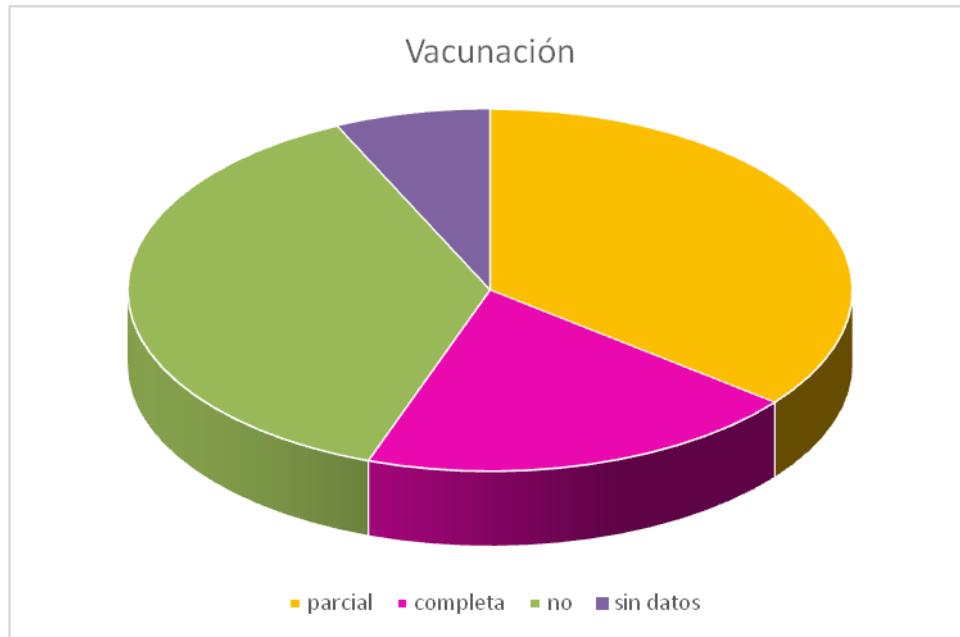


figura 14: clasificación de la población canina con CPV en función de su estado de vacunación

Clasificando a los animales vacunados o no dentro de los grupos de edad, el 59 % de los animales menores de 2 meses enfermos por CPV no se encontraban vacunados frente al 41 % que sí lo estaban. En el grupo de 2,1 a 4 meses de edad, el 36% de animales positivos a CPV no se encontraban vacunados frente al 64 % que sí lo estaban. En cuanto al grupo de 4,1 a 9 meses en este estudio, el 8% de los animales no estaban vacunados, frente al 83% que sí lo estaban. En el grupo de animales mayores de 9 meses, el 13 % de los animales no se encontraban vacunados, frente al 60 % que sí lo estaban (tabla 20 y figura 15).

Tabla 20: distribución de la población canina con CPV en función de la vacunación, atendiendo a los grupos de edad

Edad	vacunación						
	si	%	no	%	sin datos	%	n
< 2 m	16	41%	23	59%	0	0%	39
2,1 - 4 m	21	64%	12	36%	0	0%	33
4,1 - 9 m	10	83%	1	8%	1	8%	12
> 9 m	9	60%	2	13%	4	27%	15
sin datos de edad	0		0		2		99
n	56		38		7		101
%	55%		38%		7%		

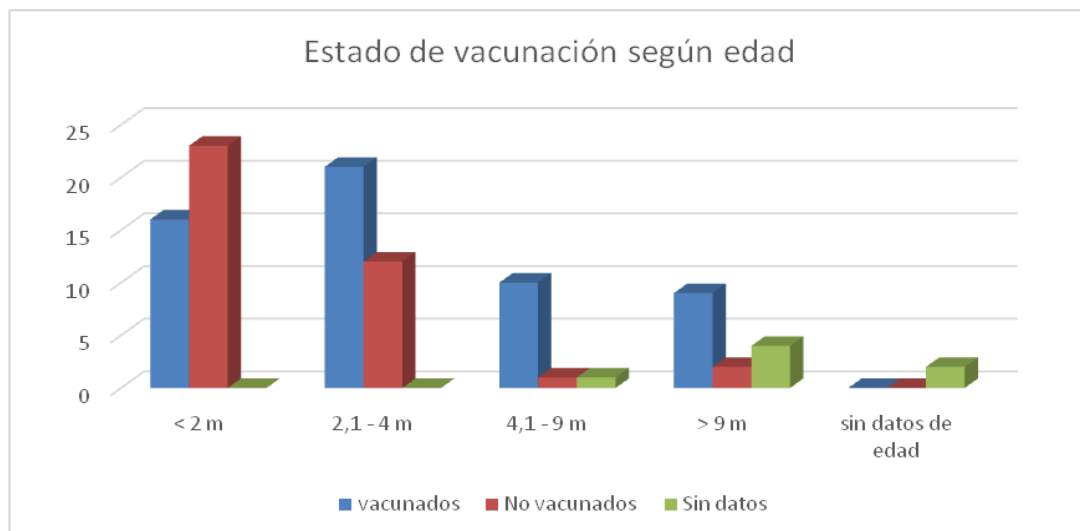


figura 15: distribución de la población canina con CPV en función de la vacunación, atendiendo a los grupos de edad

9.5. Clasificación patógena de los animales:

En cuanto a la clasificación patógena de los animales positivos a CPV (en este caso incluyendo los animales asintomáticos, es decir, trabajando con los 105 animales de especie canina en el estudio), el 60 % presentaron la sintomatología típica

digestiva; dentro de este grupo de animales, el 27 % presentaron sólo vómitos; el 17% presentaron diarrea hemorrágica leve; el 19 % presentaron diarrea hemorrágica muy severa. El 23 % del total de animales presentaron otra sintomatología añadida, además de la digestiva: en el 5% se detectaron signos neurológicos; en el 9 % signos respiratorios y en otro 9 % signos clínicos inespecíficos, como anorexia, letargia, apatía...Del total de los 105 animales de la especie canina, 6 de ellos se describen como asintomáticos (6 %): de estos, 2 sufrieron una muerte súbita sin aparición de sintomatología previa y los otros 4 animales asintomáticos en principio se incluyeron en el estudio como negativos, pero posteriormente se obtuvo un resultado positivo a alguno de los test y a la PCR. Del 12 % de animales incluidos en el estudio, no se dispone de datos en cuanto a sintomatología. (tabla 21 y figura 16)

Tabla 21: clasificación patógena según sintomatología de los animales del estudio

SINTOMATOLOGÍA			%
Sólo digestivos	Asintomáticos	6	6%
	Vómitos - gastroenteritis	28	27%
	Diarrea hemorrágica leve	18	17%
	Diarrea hemorrágica incoercible	17	16%
Otros + digestivos	Neurológicos	5	5%
	Respiratorios	9	9%
	Inespecíficos: anorexia, letargia...	9	9%
Sin datos	Sin datos	13	12%

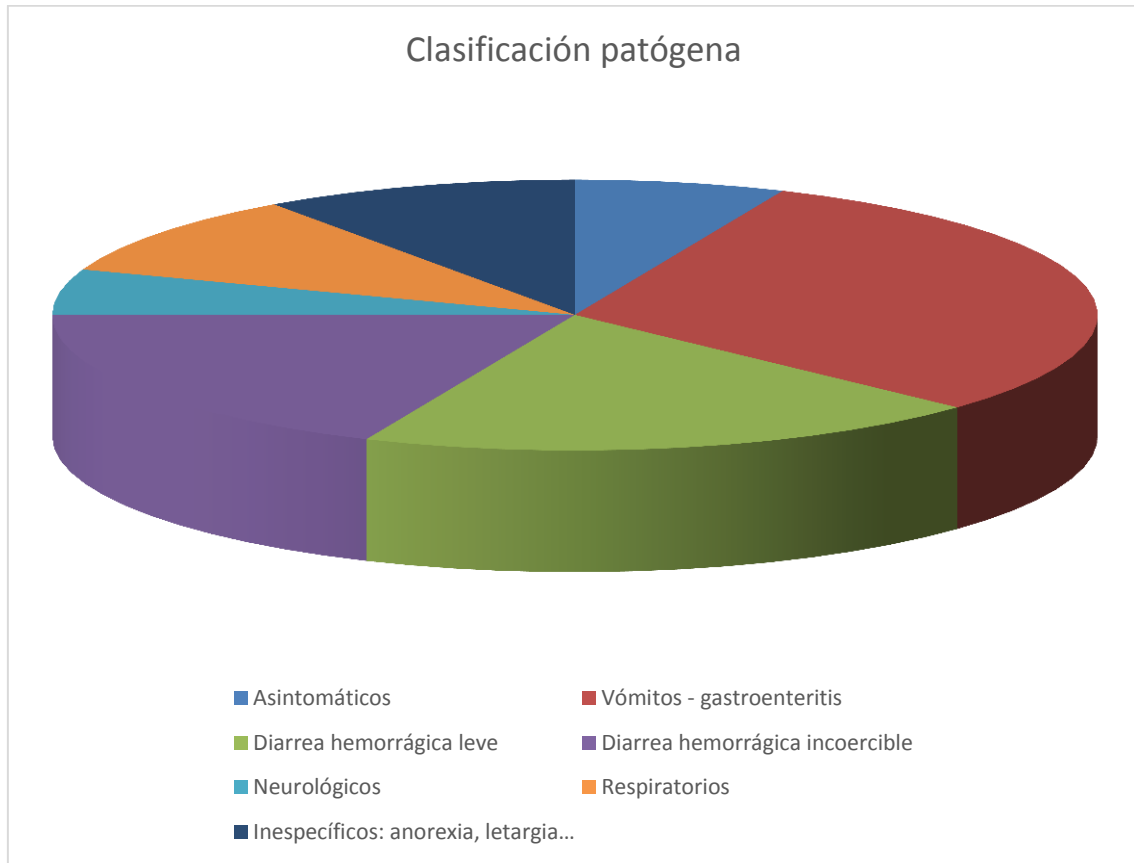


figura 16: clasificación patógena según sintomatología de los animales del estudio

10. Análisis estadístico en relación a la cepa vírica secuenciada:

10.1. *Distribución de las cepas víricas según los años de presentación:*

Tabla de contingencia Tipo cepa vírica canina o felina * Año												
Tipo cepa vírica canina o felina	Año										Total	
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013		
CPV2a	2	3	3	1	2	3	0	0	0	0	14	
CPV2b	1	0	1	0	0	1	3	0	1	0	7	
CPV2c	1	0	0	1	2	2	3	0	0	3	12	
FPV	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	
o	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	
CPVTyr426	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
CPVHis426	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
CPVSer426	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
Total	5	4	4	2	4	6	6	3	2	3	39	

Tabla 22: distribución de la cepa vírica según los años de presentación

Se ha realizado un muestreo a lo largo de 10 años (desde 2004 a 2013 ambos inclusive) de animales de especie canina con sintomatología compatible con CPV y que han sido positivos a, al menos, un test cromatográfico.

- CPV-2a: los casos encontrados pertenecientes a esta cepa se distribuyen entre los años 2004-2009, no apareciendo casos posteriormente en las muestras estudiadas.
- CPV-2b: los casos encontrados pertenecientes a esta cepa se distribuyen heterogéneamente entre 2004 y 2012, no apareciendo casos en todos los años.
- CPV-2c: aunque el primer caso perteneciente a esta cepa en las muestras estudiadas data de 2004, los casos se distribuyen principalmente entre 2007 y 2013.
- Se han encontrado 3 mutaciones no descritas hasta el momento en la posición 426, apareciendo como casos aislados a lo largo de los 10 años estudiados.
- FLPV: han aparecido 2 casos en 2011 de infección por el virus felino en 2 animales de la especie canina.

10.2. Edad de los animales afectados:

Tabla de contingencia Tipo cepa vírica canina o felina * rango de edad							
			rango de edad				Total
			< 2 m	2,1 - 4 m	4,1 - 9 m	> 9m	
Tipo cepa vírica canina o felina	CPV2a	Recuento	5	5	2	2	14
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	35,7 %	35, 7%	14, 3%	14, 3%	100,0 %
		% dentro de rango de edad	100, 0%	35, 7%	25, 0%	16, 7%	35,9%
		% del total	12,8 %	12, 8%	5,1 %	5,1 %	35,9%

Resultados

	CPV2b	Recuento	0	3	1	3	7
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	0,0%	42, 9%	14, 3%	42, 9%	100,0 %
		% dentro de rango de edad	0,0%	21, 4%	12, 5%	25, 0%	17,9%
		% del total	0,0%	7,7 %	2,6 %	7,7 %	17,9%
	CPV2c	Recuento	0	4	4	4	12
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	0,0%	33, 3%	33, 3%	33, 3%	100,0 %
		% dentro de rango de edad	0,0%	28, 6%	50, 0%	33, 3%	30,8%
		% del total	0,0%	10, 3%	10, 3%	10, 3%	30,8%
	FPV	Recuento	0	0	1	1	2
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	0,0%	0,0 %	50, 0%	50, 0%	100,0 %
		% dentro de rango de edad	0,0%	0,0 %	12, 5%	8,3 %	5,1%
		% del total	0,0%	0,0 %	2,6 %	2,6 %	5,1%
	CPVTyr426	Recuento	0	1	0	1	2
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	0,0%	50, 0%	0,0 %	50, 0%	100,0 %
		% dentro de rango de edad	0,0%	7,1 %	0,0 %	8,3 %	5,1%

		% del total	0,0%	2,6 %	0,0 %	2,6 %	5,1%
	CPVHis426	Recuento	0	1	0	0	1
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	0,0%	100 ,0%	0,0 %	0,0 %	100,0 %
		% dentro de rango de edad	0,0%	7,1 %	0,0 %	0,0 %	2,6%
		% del total	0,0%	2,6 %	0,0 %	0,0 %	2,6%
	CPVSer426	Recuento	0	0	0	1	1
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	0,0%	0,0 %	0,0 %	100 ,0%	100,0 %
		% dentro de rango de edad	0,0%	0,0 %	0,0 %	8,3 %	2,6%
		% del total	0,0%	0,0 %	0,0 %	2,6 %	2,6%
Total		Recuento	5	14	8	12	39
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	12,8 %	35, 9%	20, 5%	30, 8%	100,0 %
		% dentro de rango de edad	100, 0%	100 ,0%	100 ,0%	100 ,0%	100,0 %
		% del total	12,8 %	35, 9%	20, 5%	30, 8%	100,0 %

Tabla 23: distribución de la cepa vírica en función de la edad de los animales afectados

- CPV-2a: el 35,9 % de los animales en los que se ha secuenciado la cepa vírica pertenecen a este tipo; dentro de esta cepa, el 35,7 % son animales menores de 2 meses y el mismo porcentaje se puede encontrar también para animales de 2,1 a 4 meses. El 14,3 % son animales de 4,1 a 9 meses y el 14,3 % son animales mayores de 9 meses.
- CPV-2b: todos los animales que presentaron esta cepa eran mayores de 2 meses. El 42,9% se encontraban entre los 2,1 y los 4 meses, el 14,3 % entre los 4,1 y los 9 meses y el 42,9 % eran mayores de 9 meses.
- CPV-2c: Todos los animales que presentaron esta cepa eran mayores de 2 meses como en la cepa anterior. Los animales se encuentran distribuidos uniformemente en el resto de rangos de edad con un 33,3% de animales en cada grupo.
- FPV: 2 de los 3 animales en los que se secuenció este virus en heces eran animales adultos mayores de 9 meses, el animal restante, con 8 meses, pertenecía al grupo de 4,1 a 9 meses.
- Otras cepas estudiadas: 2 de los 3 animales se encontraban entre los 2,1 y los 4 meses de edad mientras que el animal restante era mayor de 9 meses.

10.3. Vacunación:

En cuanto a los animales positivos a CPV por PCR en relación al estado de vacunación, el 23,5 % de los animales habían recibido un protocolo de vacunación completo para su edad, mientras que el 35,7 % habían recibido un protocolo de vacunación parcial frente a CPV. El 37,8 % de los animales positivos por PCR no habían recibido ninguna dosis vacunal frente a CPV

Tabla de contingencia Vacunación * PCR					
			PCR		Total
			Negativo	Positivo	
Vacunación	No	Recuento	1	37	38
		% dentro de Vacunación	2,6%	97,4%	100,0 %
		% dentro de PCR	33,3%	38,9%	38,8%
		% del total	1,0%	37,8%	38,8%
	Parcial	Recuento	1	35	36
		% dentro de Vacunación	2,8%	97,2%	100,0 %
		% dentro de PCR	33,3%	36,8%	36,7%
		% del total	1,0%	35,7%	36,7%
	Completa	Recuento	1	23	24
		% dentro de Vacunación	4,2%	95,8%	100,0 %
		% dentro de PCR	33,3%	24,2%	24,5%
		% del total	1,0%	23,5%	24,5%
Total		Recuento	3	95	98
		% dentro de Vacunación	3,1%	96,9%	100,0 %
		% dentro de PCR	100,0 %	100,0 %	100,0 %
		% del total	3,1%	96,9%	100,0 %

Tabla 24: estado de vacunación de los animales positivos a PCR

En cuanto a las muestras en las que se ha secuenciado y determinado la cepa vírica presente, los resultados son los siguientes:

- CPV-2a: el 71,42 % de los animales de este grupo se encontraba total o

parcialmente vacunado, mientras que el 28,6 % no había recibido ninguna dosis vacunal frente a CPV2.

- CPV-2b: el 50 % de los animales se encontraba total o parcialmente vacunado, mientras que el otro 50 % no había recibido ninguna dosis vacunal frente a CPV.
- CPV2c: el 63,6 % de los animales se encontraban total o parcialmente vacunados, frente al 36,4 % que no se encontraba vacunado.
- FPV: los 2 animales positivos a FPV se encontraban totalmente vacunados frente a CPV.
- CPVTyr426: de los 2 animales en los que se ha detectado esta variante del CPV, uno había recibido un protocolo de vacunación frente a CPV completo y el otro sólo parcial.
- CPVHis426: el animal en el que se ha detectado esta mutación se encontraba parcialmente vacunado frente a CPV, habiendo recibido una dosis vacunal frente a esta enfermedad.
- CPVSer426: el animal en el que se ha detectado esta mutación presentaba un protocolo de vacunación completo frente a CPV.

Tabla de contingencia Tipo cepa vírica canina o felina * Vacunación

			Vacunación			Total
			No	Parcial	Completa	
Tipo cepa vírica canina o felina	CPV2a	Recuento	4	6	4	14
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	28,6 %	42,9 %	28,6 %	100,0 %
		% dentro de Vacunación	40,0 %	54,5 %	28,6 %	40,0 %
		% del total	11,4 %	17,1 %	11,4 %	40,0 %
	CPV2b	Recuento	2	1	1	4
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	50,0 %	25,0 %	25,0 %	100,0 %

Resultados

		% dentro de Vacunación	20,0 %	9,1%	7,1%	11,4 %
		% del total	5,7%	2,9%	2,9%	11,4 %
	CPV2c	Recuento	4	2	5	11
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	36,4 %	18,2 %	45,5%	100,0 %
		% dentro de Vacunación	40,0 %	18,2 %	35,7%	31,4 %
		% del total	11,4 %	5,7%	14,3%	31,4 %
	FPV	Recuento	0	0	2	2
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	0,0%	0,0%	100,0 %	100,0 %
		% dentro de Vacunación	0,0%	0,0%	14,3%	5,7%
		% del total	0,0%	0,0%	5,7%	5,7%
	CPVTyr4 26	Recuento	0	1	1	2
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	0,0%	50,0 %	50,0%	100,0 %
		% dentro de Vacunación	0,0%	9,1%	7,1%	5,7%
		% del total	0,0%	2,9%	2,9%	5,7%
	CPVHis42 6	Recuento	0	1	0	1
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	0,0%	100,0 %	0,0%	100,0 %
		% dentro de Vacunación	0,0%	9,1%	0,0%	2,9%
		% del total	0,0%	2,9%	0,0%	2,9%
	CPVSer4 26	Recuento	0	0	1	1
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	0,0%	0,0%	100,0 %	100,0 %
		% dentro de Vacunación	0,0%	0,0%	7,1%	2,9%

Resultados

		% del total	0,0%	0,0%	2,9%	2,9%
Total		Recuento	10	11	14	35
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	28,6 %	31,4 %	40,0%	100,0 %
		% dentro de Vacunación	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %
		% del total	28,6 %	31,4 %	40,0%	100,0 %

Tabla 25: distribución de la cepa vírica en función del estado de vacunación del animal

10.4. Sintomatología:

El 6,7 % de los animales positivos a PCR en este estudio son asintomáticos. El resto de los animales muestra como sintomatología principal signos digestivos, combinada o no con otros signos clínicos.

Tabla de contingencia Asintomáticos * PCR					
			PCR		Total
			Negativo	Positivo	
Asintomáticos	No	Recuento	2	84	86
		% dentro de Asintomáticos	2,3%	97,7%	100,0 %
		% dentro de PCR	100,0%	93,3%	93,5%
		% del total	2,2%	91,3%	93,5%
	Sí	Recuento	0	6	6
		% dentro de Asintomáticos	0,0%	100,0 %	100,0 %
		% dentro de PCR	0,0%	6,7%	6,5%
		% del total	0,0%	6,5%	6,5%
Total		Recuento	2	90	92

	% dentro de Asintomáticos	2,2%	97,8%	100,0 %
	% dentro de PCR	100,0%	100,0 %	100,0 %
	% del total	2,2%	97,8%	100,0 %

Tabla 26: animales asintomáticos incluidos en los positivos a PCR

Dentro del grupo de animales positivos a PCR que presentaron la sintomatología típica digestiva, el 39,6 % de los animales presentaron vómitos y diarrea leve sin signos de sangre, el 22 % presentaron vómitos y diarrea hemorrágica leve y el 27,5 % de animales presentaron vómitos y diarrea hemorrágica incoercible.

Tabla de contingencia Digestivo * PCR					
			PCR		Total
			Negativo	Positivo	
Digestivo	No	Recuento	1	10	11
		% dentro de Digestivo	9,1%	90,9%	100,0 %
		% dentro de PCR	50,0%	11,0%	11,8%
		% del total	1,1%	10,8%	11,8%
	vómitos	Recuento	1	36	37
		% dentro de Digestivo	2,7%	97,3%	100,0 %
		% dentro de PCR	50,0%	39,6%	39,8%
		% del total	1,1%	38,7%	39,8%
	diarrea leve	Recuento	0	20	20
		% dentro de Digestivo	0,0%	100,0 %	100,0 %
		% dentro de PCR	0,0%	22,0%	21,5%
		% del total	0,0%	21,5%	21,5%

	diarrea severa	Recuento	0	25	25
		% dentro de Digestivo	0,0%	100,0 %	100,0 %
		% dentro de PCR	0,0%	27,5%	26,9%
		% del total	0,0%	26,9%	26,9%
Total		Recuento	2	91	93
		% dentro de Digestivo	2,2%	97,8%	100,0 %
		% dentro de PCR	100,0 %	100,0 %	100,0 %
		% del total	2,2%	97,8%	100,0 %

Tabla 27: animales con sintomatología digestiva positivos a PCR

En los animales seleccionados aleatoriamente en los que se ha secuenciado la cepa de parvovirus presente, se obtuvieron los siguientes resultados:

- CPV-2a: el 36,1% de los animales pertenecen a esta cepa; dentro de ella, el 53,8 % pertenecientes a la cepa presentaron sólo vómitos, el 7,7% vómitos junto con diarrea leve y el 23,1 % de los animales vómitos y diarrea severa.
- CPV2b: El 16,7 % de los animales pertenecen a esta cepa; dentro de ella, el 66,7 % de los animales presentaron sólo vómitos, el 16,7 % vómitos y diarrea y el 16,7% vómitos y diarrea severa.
- CPV2c: el 33,3% de los animales pertenecen a esta cepa; dentro de ella, el 16,7 % de los animales presentaron sólo vómitos, el 33,3% de los animales vómitos y diarrea leve y el 50% de los animales vómitos y diarrea severa.
- FPV: el 5,6 % de los animales pertenecen a esta cepa; dentro de ella, el 100% de los animales presentaron vómitos.
- CPVTyr426: el 5,6 % de los animales pertenecen a esta cepa; dentro de ella, el 50% de los animales presentaron vómitos y el otro 50% de animales eran asintomáticos.
- CPVSer426: el 2,8% de los animales pertenecen a esta cepa; el animal

detectado con esta mutación no presenta sintomatología digestiva.

Tabla de contingencia Tipo cepa vírica canina o felina * Digestivo							
			Digestivo				Total
			No	vómitos	diarrea leve	diarrea severa	
Tipo cepa vírica canina o felina	CPV2a	Recuento	2	7	1	3	13
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	15,4%	53,8%	7,7%	23,1%	100,0%
		% dentro de Digestivo	50,0%	43,8%	16,7%	30,0%	36,1%
		% del total	5,6%	19,4%	2,8%	8,3%	36,1%
	CPV2b	Recuento	0	4	1	1	6
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	0,0%	66,7%	16,7%	16,7%	100,0%
		% dentro de Digestivo	0,0%	25,0%	16,7%	10,0%	16,7%
		% del total	0,0%	11,1%	2,8%	2,8%	16,7%
	CPV2c	Recuento	0	2	4	6	12
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	0,0%	16,7%	33,3%	50,0%	100,0%
		% dentro de Digestivo	0,0%	12,5%	66,7%	60,0%	33,3%
		% del total	0,0%	5,6%	11,1%	16,7%	33,3%

Resultados

	FPV	Recuento	0	2	0	0	2
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%
		% dentro de Digestivo	0,0%	12,5%	0,0%	0,0%	5,6%
		% del total	0,0%	5,6%	0,0%	0,0%	5,6%
	CPVTyr4 26	Recuento	1	1	0	0	2
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	50,0%	50,0%	0,0%	0,0%	100,0%
		% dentro de Digestivo	25,0%	6,2%	0,0%	0,0%	5,6%
		% del total	2,8%	2,8%	0,0%	0,0%	5,6%
	CPVSer4 26	Recuento	1	0	0	0	1
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%
		% dentro de Digestivo	25,0%	0,0%	0,0%	0,0%	2,8%
		% del total	2,8%	0,0%	0,0%	0,0%	2,8%
	Total	Recuento	4	16	6	10	36
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	11,1%	44,4%	16,7%	27,8%	100,0%
		% dentro de Digestivo	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Resultados

	% del total	11,1%	44,4%	16,7%	27,8%	100,0%
--	-------------	-------	-------	-------	-------	--------

Tabla 28: distribución de la cepa vírica en función de la sintomatología digestiva

Se ha estudiado la presencia de sintomatología digestiva junto con otros síntomas dentro de los animales en los que se ha secuenciado la cepa vírica:

- Sintomatología digestiva y respiratoria: el 8,3 % de los animales presentaron sintomatología conjunta, perteneciendo el 33,3% a las cepas CPV2a, 2b y 2c respectivamente.

Tabla de contingencia Tipo cepa vírica canina o felina * Digestivo+Respiratorio

			Digestivo+Respiratorio		Total
			No	Sí	
Tipo cepa vírica canina o felina	CPV2a	Recuento	12	1	13
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	92,3%	7,7%	100,0%
		% dentro de Digestivo+Respiratorio	36,4%	33,3%	36,1%
		% del total	33,3%	2,8%	36,1%
	CPV2b	Recuento	5	1	6
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	83,3%	16,7%	100,0%
		% dentro de Digestivo+Respiratorio	15,2%	33,3%	16,7%
		% del total	13,9%	2,8%	16,7%
	CPV2c	Recuento	11	1	12
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	91,7%	8,3%	100,0%
		% dentro de	33,3%	33,3%	33,3%

		Digestivo+Respiratorio			
		% del total	30,6%	2,8%	33,3%
	FPV	Recuento	2	0	2
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	100,0%	0,0%	100,0 %
		% dentro de Digestivo+Respiratorio	6,1%	0,0%	5,6%
		% del total	5,6%	0,0%	5,6%
	CPVTyr426	Recuento	2	0	2
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	100,0%	0,0%	100,0 %
		% dentro de Digestivo+Respiratorio	6,1%	0,0%	5,6%
		% del total	5,6%	0,0%	5,6%
	CPVSer426	Recuento	1	0	1
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	100,0%	0,0%	100,0 %
		% dentro de Digestivo+Respiratorio	3,0%	0,0%	2,8%
		% del total	2,8%	0,0%	2,8%
	Total	Recuento	33	3	36
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	91,7%	8,3%	100,0 %
		% dentro de Digestivo+Respiratorio	100,0%	100,0%	100,0 %
		% del total	91,7%	8,3%	100,0 %

Tabla 29: distribución de la cepa vírica en función de la presentación de sintomatología digestiva junto con respiratoria concomitante

- Sintomatología digestiva y neurológica: el 5,6% de los animales presentaban esta sintomatología conjunta, perteneciendo el 50 % a la cepa CPV2a y el otro 50% a la cepa CPV2c.

Tabla de contingencia Tipo cepa vírica canina o felina * Digestivo+Neurológico					
			Digestivo+Neurológico		Total
			No	Sí	
Tipo cepa vírica canina o felina	CPV2a	Recuento	12	1	13
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	92,3%	7,7%	100,0 %
		% dentro de Digestivo+Neurológico	35,3%	50,0%	36,1%
		% del total	33,3%	2,8%	36,1%
	CPV2b	Recuento	6	0	6
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	100,0%	0,0%	100,0 %
		% dentro de Digestivo+Neurológico	17,6%	0,0%	16,7%
		% del total	16,7%	0,0%	16,7%
	CPV2c	Recuento	11	1	12
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	91,7%	8,3%	100,0 %
		% dentro de Digestivo+Neurológico	32,4%	50,0%	33,3%

Resultados

		o			
		% del total	30,6%	2,8%	33,3%
	FPV	Recuento	2	0	2
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	100,0%	0,0%	100,0 %
		% dentro de Digestivo+Neurológic o	5,9%	0,0%	5,6%
		% del total	5,6%	0,0%	5,6%
	CPVTyr426	Recuento	2	0	2
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	100,0%	0,0%	100,0 %
		% dentro de Digestivo+Neurológic o	5,9%	0,0%	5,6%
		% del total	5,6%	0,0%	5,6%
	CPVSer426	Recuento	1	0	1
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	100,0%	0,0%	100,0 %
		% dentro de Digestivo+Neurológic o	2,9%	0,0%	2,8%
		% del total	2,8%	0,0%	2,8%
	Total		Recuento	34	2
			% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	94,4%	5,6%
					100,0 %

	% dentro de Digestivo+Neurológico	100,0%	100,0%	100,0%
	% del total	94,4%	5,6%	100,0%

Tabla 30: distribución de la cepa vírica en función de la presentación de sintomatología digestiva junto con neurológica concomitante

- Animales asintomáticos: el 8,3% de los animales no presentaban sintomatología alguna, perteneciendo el 33,3% a la cepa CPV2a, CPVTyr426 y CPV2c respectivamente.

Tabla de contingencia Tipo cepa vírica canina o felina * Asintomáticos					
			Asintomáticos		Total
			No	Sí	
Tipo cepa vírica canina o felina	CPV2a	Recuento	12	1	13
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	92,3%	7,7%	100,0%
		% dentro de Asintomáticos	36,4%	33,3%	36,1%
		% del total	33,3%	2,8%	36,1%
	CPV2b	Recuento	6	0	6
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	100,0%	0,0%	100,0%
		% dentro de Asintomáticos	18,2%	0,0%	16,7%
		% del total	16,7%	0,0%	16,7%
	CPV2c	Recuento	12	0	12
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	100,0%	0,0%	100,0%
		% dentro de Asintomáticos	18,2%	0,0%	16,7%
		% del total	16,7%	0,0%	16,7%

Resultados

		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	100,0 %	0,0%	100,0 %
		% dentro de Asintomáticos	36,4%	0,0%	33,3%
		% del total	33,3%	0,0%	33,3%
	FPV	Recuento	2	0	2
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	100,0 %	0,0%	100,0 %
		% dentro de Asintomáticos	6,1%	0,0%	5,6%
		% del total	5,6%	0,0%	5,6%
	CPVTyr4 26	Recuento	1	1	2
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	50,0%	50,0%	100,0 %
		% dentro de Asintomáticos	3,0%	33,3%	5,6%
		% del total	2,8%	2,8%	5,6%
	CPVSer4 26	Recuento	0	1	1
		% dentro de Tipo cepa vírica canina o felina	0,0%	100,0 %	100,0 %
		% dentro de Asintomáticos	0,0%	33,3%	2,8%
		% del total	0,0%	2,8%	2,8%
	Total		Recuento	33	3
			% dentro de Tipo cepa vírica canina o	91,7%	8,3%
					100,0 %

	felina			
	% dentro de Asintomáticos	100,0 %	100,0 %	100,0 %
	% del total	91,7%	8,3%	100,0 %

Tabla 31: distribución de la cepa vírica en función de la ausencia de sintomatología

11. Parvovirus canino en otras especies animales:

En el presente estudio se han procesado muestras de 5 pacientes felinos con sintomatología compatible con panleucopenia felina, además de 2 hurones y un panda rojo cuyas muestras llegaron directamente a la sala de necropsias del HCV Complutense. Los resultados obtenidos se exponen en la tabla 32-

Cepa	Año	Edad	sex o	Especie y raza	vacunación	sintomatología	Enf. Concomitantes	Muerte
CPV- 2a	2007	5m	h	Mustela putorios furo	no	gastroenteritis hemorrágica	No	Si
CPV- 2a	2006	2m	h	Ailurus fulgens	no	Neurológica y respiratoria	No	Si
CPV- 2a	2011	5 a	m	Gato siamés	no	Anorexia, vómitos	FLUTD	No

Tabla 32: cepas de parvovirus halladas otras especies animales

VII.- DISCUSIÓN

VII. Discusión:

Los parvovirus de los carnívoros son un grupo de virus relacionados entre sí que infectan carnívoros tanto domésticos como salvajes. Inducen una gran variedad de formas clínicas, desde infecciones subclínicas a infecciones severas, a veces mortales. Los signos clínicos característicos incluyen pérdida de apetito, depresión, fiebre, leucopenia y gastroenteritis hemorrágica. Además del virus de la panleucopenia felina (FPLV) y el parvovirus canino tipo 2 (CPV-2), conocidos y estudiados desde la década de los años 20 y 70 del siglo pasado respectivamente, se han detectado otros parvovirus en carnívoros salvajes (Decaro y Buonavoglia, 2012). Los parvovirus de los carnívoros, incluidos el CPV y FPLV, son miembros del género Parvovirus, familia Parvoviridae, subfamilia Parvovirinae.

El CPV es un patógeno muy importante de la población canina. Es un virus de tamaño pequeño, sin envuelta, de cadena simple con un genoma de unos 5.2 kb que codifica 2 proteínas estructurales (VP1 and VP2) y 2 proteínas no estructurales (NS1 and NS2) (Cotmore and Tattersall, 1987). VP2 es la proteína mayor de la cápside y juega un papel muy importante como determinante antigénico (Chang y col., 1992; Horiuchi y col., 1994).

El primer brote emergente de esta enfermedad fue descrito en la década de los 70 (Appel y col., 1978; Kelly, 1978). Posteriormente, la cepa original de CPV-2 fue remplazado completamente por 2 variantes antigénicas nuevas, llamadas CPV-2a and CPV-2b (Parrish y col., 1988). En el año 2000, se describió una nueva mutación de CPV, con una mutación en la posición 426, que pasó a denominarse CPV-2c. Esta nueva cepa emergió en Italia y rápidamente se diseminó a otros países (Buonavoglia y col., 2001; Decaro and Buonavoglia, 2012). Las diferencias antigénicas entre los distintos tipos de CPV se deben a sustituciones aminoácidas en 5 loci en la proteína VP2 de la cápside vírica (Desario y col., 2005). Estos cambios se suponen asociados con la antigenicidad, rango de hospedador y patogenicidad del virus (Carmichael, 2005; Chang y col., 1992; Llamas-Saiz y col., 1996; Moon y col., 2008). El potencial patógeno de los distintos subtipos de CPV-2 no está claro. La infección por CPV supone una

enfermedad entérica altamente contagiosa, con altas tasas de morbilidad y mortalidad (Larson y Schultz, 2007; Parrish, 1990, 1999). Desde que las nuevas cepas 2a y 2b remplazaron a la original CPV2, y con la aparición de la cepa más reciente CPV-2c, se ha cuestionado en múltiples ocasiones la eficacia de las vacunas existentes, ya que están basadas en la cepa original CPV-2. Existen algunos estudios en los que se ha demostrado que las vacunas frente a CPV son capaces de inferir protección frente a las cepas de campo 2a y 2b (Greenwood y col., 1995). Inicialmente, la nueva cepa CPV-2c se detectó en adultos vacunados con gastroenteritis severa, por lo que se pensó que podría tratarse de una cepa frente a la que las vacunas existentes no producían una inmunidad adecuada (Decaro y col., 2008, 2009a). Esta teoría fue posteriormente desmentida en otros estudios en los que se comprobó que los perros vacunados se encontraban protegidos frente a esta cepa bajo condiciones experimentales (Larson and Schultz, 2008; Spibey y col., 2008). Además, se evidenció que la tasa de detección de CPV-2c en animales enfermos vacunados frente a parvovirus en los EEUU era similar a los otros subtipos (Hong y col., 2007). En Italia, país en el que primero se describió la cepa CPV-2c, el aumento de detección de esta cepa no estuvo acompañado por un aumento en los casos de enteritis por parvovirus (Martella y col., 2005).

Para evitar los brotes de CPV es muy importante un diagnóstico temprano y rápido, sobre todo en perreras, protectoras de animales y hospitales veterinarios, donde la densidad de animales es mayor y la diseminación puede ser más rápida. En estos casos, un diagnóstico temprano permitirá aislar y tratar a los animales afectados con un tratamiento de soporte adecuado para reducir tanto la morbilidad como la mortalidad, así como evitar la diseminación del virus (Decaro y col., 2010; Markovich y col., 2012; Decaro y col., 2013).

El diagnóstico de CPV está basado principalmente en la sintomatología clínica, incluyendo vómitos y diarrea; esta sintomatología es común a otras enfermedades entéricas, por lo que un realizar un diagnóstico definitivo en base a los síntomas resulta dificultoso (Elia y col., 2007; Hirasawa y col., 1994). Se han desarrollado métodos convencionales de detección de CPV, eficaces y seguros, como microscopía electrónica (Teramoto y col., 1984), aislamiento vírico (Mochizuki y col., 1993), aglutinación en látex (Veijalainen y col., 1986), hemaglutinación (Mochizuki y col.,

1993; Teramoto y col., 1984), y ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) (Drane y col., 1994; Teramoto y col., 1984). Se han utilizado también técnicas de detección molecular, incluyendo PCR convencional (Mochizuki y col., 1993), PCR a tiempo real (Decaro y col., 2005), PCR anidada (Hirasawa y col., 1994), y amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP) (Cho y col., 2006; Mukhopadhyay y col., 2012), aunque la sensibilidad y la especificidad de estas técnicas son variables. El mayor problema de estas técnicas es que son métodos laboriosos y más caros.

6. Subtipos y distribución:

Las mutaciones puntuales en la proteína VP2 del genoma del parvovirus se han asociado con los distintos tipos de parvovirus canino. El análisis de la secuencia puede proporcionar una amplia información del tipo de CPV si el fragmento amplificado por PCR convencional engloba al menos un aminoácido informativo, como es el residuo 426 de la proteína VP2. El cambio del aminoácido de la posición 426 puede diferenciar CPV2a (Asn), CPV-2b (Asp) y CPV-2c (Glu).

Las secuencias estudiadas de VP2 demuestran una alta variabilidad en los residuos 427, 440, 445, 512 y 580. La mayor variabilidad en VP2 se produce alrededor del residuo 440 (Kang, B.K. y col., 2008; Zhao y col., 2013; Timurkan y Oguzoglu, 2015). Este residuo destaca por ser un factor importante para la antigenicidad (Decaro y col., 2009; Timurkan y Oguzoglu, 2015). Un elevado número de sustituciones en esta región se asocian con la evolución de las variantes antigénicas en los distintos tipos de CPV circulantes (Ikeda. Y. y col., 2000; Battilani, M. y col., 2002; Chinchkar, S.R. y col., 2006; Timurkan y Oguzoglu, 2015).

Según estudios previos, la variante CPV2c predomina en Italia, Alemania y España (Decaro y col., 2007; Decaro y col., 2011; Decaro y col., 2012), estando también ampliamente distribuida en Portugal, Francia y Bélgica, aunque en estos países las variantes 2b o 2a parecen ser más frecuentes. Se ha aislado esporádicamente CPV-2c en Reino Unido, Grecia y Bulgaria, donde hay una frecuencia mayor de CPV-2a y 2b (Decaro y col., 2007; Ntafis y col., 2010; Filipov y col., 2011; Decaro y col., 2012). En los últimos estudios realizados en Reino Unido en los que se analizaron las secuencias de

VP2 de 150 muestras, no se encontró la variante 2c (Clegg y col., 2011; Decaro y col., 2012).

El trabajo de Filipov y col. comprende un estudio retrospectivo a lo largo de 10 los últimos 10 años en Bulgaria (Filipov y col., 2015) indicando una alta frecuencia de aparición del CPV-2a. Esto coincide con anteriores estudios realizados en otros países de la zona, como Albania y Grecia (Ntafis y col., 2010; Cavalli y col., 2014). En este estudio sólo detectaron 5 muestras positivas para CPV-2c a pesar de la amplia distribución de esta cepa en Europa oriental (Decaro and Buonavoglia, 2012).

Analizando las secuencias predominantes fuera de Europa, los tipos 2b y 2c predominan en Norteamérica (Kapil, S. y col., 2007; Hong, C. y col. 2007), mientras que la variante 2c es más frecuente en Sudamérica (Calderón, M. G. y col. 2009; Pérez, R. y col., 2009), excepto en Brasil en que todas las cepas estudiadas se han caracterizado como CPV-2a (Castro y col., 2011).

Existen muy pocos estudios sobre la circulación del parvovirus en el continente africano. En un estudio publicado en 1998 en Sudáfrica y Namibia (Steinel y col., 1998), se detectó principalmente CPV2b en un 67 % de los animales estudiados, siendo la frecuencia de aparición de CPV2a de un 33%. En este estudio no se detectó CPV2c. Los últimos estudios realizados en Sudáfrica no han detectado CPV2c (Dogonyaro y col., 2013). En Túnez se han detectado circulando las 3 variantes antigénicas, prevaleciendo CPV2b en un 42% (Touihri y col., 2009). Los estudios realizados en India revelan la prevalencia de 2a y 2c (Nandi, S. y col., 2010). Los trabajos realizados en China, no revelan la presencia de CPV-2c, siendo CPV-2a la más frecuente (Zang Q y col., 2010; Zhang, R. y col 2010; Zhao y col., 2013).

En Australia, la variante predominante es la 2a (Meers y col., 2007), así como en Nueva Zelanda. .

La presencia de las cepas circulantes en España ha sido pobremente estudiada, existiendo tan sólo 2 estudios realizados por Decaro y col., de la Facultad de medicina veterinaria de Bari (Italia). El primer hallazgo de CPV-2c se realizó en un brote de enteritis hemorrágica asociada a parvovirus y coronavirus canino, con una gran

mortalidad, en el año 2006 (Decaro y col., 2006). El estudio estuvo limitado a una zona geográfica pequeña (Tarragona), y a una única fuente de muestras clínicas, ya que el brote se produjo en un criadero canino de la raza Basset Hound, en el que se vieron implicados 7 cachorros de la misma camada. Todos los cachorros tenían unos 40 días de vida y no habían sido inmunizados frente al parvovirus canino. En este estudio se tomaron muestras de heces de toda la camada y se realizó una PCR en tiempo real con sondas para MGB, reconociéndose la cepa como tipo 2c. Realizaron también un análisis posterior de secuencias mediante los primers 555for/555rev (Buonavoglia y col., 2001), obteniendo una identidad del 100% con la cepa descrita por Buonavoglia como 56/00, habiendo sido clasificada en trabajos anteriores como 2c.

En un estudio más reciente en 2011, Decaro y colaboradores recogieron 47 muestras a lo largo de toda la geografía española, así como en otros países europeos (Decaro, N., y col., 2011), de las que 13 resultaron positivas a CPV. Mediante PCR en tiempo real con sondas Taqman, caracterizaron 9 de la 13 muestras como CPV2c, pero las muestras no fueron secuenciadas por lo que no se realizó un análisis de las mismas para detectar la presencia o ausencia de mutaciones características de la zona.

En el presente trabajo se ha estudiado una parte de la secuencia de VP2 del CPV para determinar la distribución de la infección de CPV e investigar la variabilidad genética de las cepas circulantes de CPV desde 2004 hasta 2013, ambos inclusive. El análisis de las secuencias seleccionadas aleatoriamente indica que la variante CPV-2a es la más frecuente, seguida de la variante CPV-2c. Se ha detectado CPV-2b en menor número y se han registrado de manera anecdótica algunos casos de animales de especie canina afectados por el virus de la panleucopenia felina y otras mutaciones del residuo 426 circulantes de CPV en nuestro país. Todos estos datos demuestran el constante cambio del virus y la presencia de mutaciones constantes en el DNA vírico, así como la adaptación de los virus a distintos hospedadores.

En el presente trabajo, en nuestro país, se ha detectado la presencia de CPV-2c desde el año 2004, circulando y produciendo enfermedad clínica 2 años antes que en el estudio realizado por Decaro y col. en 2006.

6. Rango de hospedador:

Mientras que in vitro, FLPV se replica eficazmente sólo en líneas felinas, el parvovirus canino puede infectar líneas tanto caninas como felinas con la misma eficacia. En los estudios realizados con FLPV el virus se replica en perros en el timo y médula ósea y se supone que no se excreta por heces (Truyen, 2006; Decaro y col., 2012).

El CPV original no se replicaba en gatos, pero tanto la variante 2a como la 2b volvieron a tener la capacidad de replicarse en hospedadores felinos (Truyen, 2006; Decaro y col., 2012). Se han descrito tan sólo 3 casos de CPV2c en pacientes felinos en Italia (Battilani y col., 2006; Decaro y col, 2010; Decaro y col., 2011), desarrollando una forma leve de la infección gastrointestinal en 2 de los 3 animales (del tercero no se disponen de datos).

En estudios más recientes (Filipov y col., 2015) en los que se han estudiado animales de especie felina con signos compatibles con panleucopenia felina, tan sólo 1 de los 19 gatos incluidos en este estudio estaba infectado por un parvovirus canino, en concreto un CPV-2a.

En nuestro estudio, se han detectado 2 casos del virus de la panleucopenia felina en heces caninas, ambos con sintomatología clínica típica digestiva; el primer caso se trataba de un pastor alemán de 8 meses, primovacunado correctamente, que presentó un cuadro de gastroenteritis severa sin diarrea hemorrágica que requirió de hospitalización y tratamiento intensivo para su correcta evolución. El animal resultó positivo al test rápido SNAP IDEXX, descubriendo tras la secuenciación que se trataba de un FLPV. El animal no convivía ni tenía contacto directo con gatos en su entorno cercano. El segundo caso se trataba de un perro mestizo de 7 años, primovacunado y revacunado anualmente, que falleció de una gastroenteritis hemorrágica aguda, CPV positivo en test rápido y PCR, comprobando que se trataba de un virus de la panleucopenia felina en la secuenciación. El animal tampoco convivía con gatos en su hogar ni en su entorno cercano. El tercer caso será comentado en el siguiente párrafo.

En el presente estudio se han incluido 2 muestras felinas en la secuenciación:

- En uno de los casos se ha secuenciado CPV-2a; corresponde a un gato adulto de 5 años, indoor, con signos clínicos y analíticos compatibles con panleucopenia felina y sin vacunar. Se postuló que se trataba de un caso de CPV ya que el gato convivía con un perro adulto de raza Golden retriever, de 3 años de edad, primovacunado correctamente y revacunado anualmente, que sí tenía contacto con el exterior y que no tenía sintomatología clínica, por lo que se trataría de un portador asintomático. Se diagnosticó al paciente felino de panleucopenia/parvovirus mediante un test snap ELISA IDEXX, confirmándose posteriormente la presencia del virus por PCR. La secuenciación confirmó la presencia de una cepa del parvovirus canino, en concreto de la cepa CPV-2a. Se tomaron también muestras del paciente asintomático canino, con resultados positivos tanto al test snap ELISA IDEXX para CPV como a PCR. Al secuenciar el virus presente en las heces caninas se comprobó que se trataba de un parvovirus canino, con una mutación en el aminoácido 426, presentando Serina en esa posición. ado como portador asintomático del virus felino.
- La segunda muestra felina corresponde a un gatito de un mes con sintomatología neurológica a consecuencia de hipoplasia cerebelar, secuenciándose un FLPV.

Por tanto, en nuestro estudio se han encontrado un caso de CPV afectando a un paciente felino, secuenciándose una cepa CPV-2a. Estos datos corresponden con los descritos en otros países por Truyen en 2006, Decaro y col. en 2012, Battilani y col. en 2006 y Filipov y col. en 2015. No se han encontrado casos de CPV-2c afectando a la especie felina, pero el número de casos estudiado es insuficiente como para afirmar que esta cepa no afecta a pacientes felinos en nuestro país.

3. Métodos de detección de CPV:

El parvovirus canino representa todavía una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en cachorros, a pesar de la vacunación ampliamente distribuida. La sospecha clínica de una infección por parvovirus debe confirmarse siempre mediante test laboratoriales, ya que las causas de diarrea hemorrágica en la especie canina son muy variadas, implicando otros virus, parásitos, desórdenes alimentarios, etc. Un

diagnóstico rápido y definitivo es crucial, especialmente en zonas con de alta densidad de animales, como centros de protección animal, residencias caninas, hospitales veterinarios, etc. En estas situaciones es esencial aislar a los animales infectados, comenzar un tratamiento temprano y evitar la diseminación del virus. Los test rápidos comerciales son los únicos que permiten un diagnóstico inmediato, en la propia clínica, de bajo costo, con una muestra de heces del animal. De acuerdo a los últimos estudios, estos test parecen detectar las nuevas cepas de CPV-2c (Decaro y col., 2010; Markovich y col., 2012; Decaro y col., 2013). Los test inmunocromatográficos son menos sensibles comparados con los métodos laboratoriales, ya que necesitan una cantidad significativa de antígeno vírico para producir una banda visible. Estos métodos tradicionales son los más utilizados en la práctica diaria, existiendo numerosos test basados en la detección de anticuerpos (Greene, 2012, Decaro y col., 2012). Además, la interpretación de los resultados depende de la subjetividad del individuo, sobre todo cuando la cantidad de virus es baja. Por lo tanto, es necesario utilizar técnicas de laboratorio más sofisticadas para obtener un diagnóstico certero de enteritis por parvovirus, como hemaglutinación, aislamiento vírico y reacción en cadena de la polimerasa. Estas técnicas sólo pueden utilizarse en laboratorios especializados y por personal cualificado. A pesar del poco tiempo que requiere la realización de la hemaglutinación, no es de los más utilizados debido a la necesidad de utilizar eritrocitos porcinos (Desario y col., 2005). Además, algunas cepas no tienen actividad hemaglutinadora (Parrish y col., 1988; Cavalli y col., 2001). Por otra parte, el aislamiento vírico requiere mucho tiempo (con un periodo de incubación mínimo de 5-10 días) y laborioso (requiere personal especializado, cultivos celulares,...).

El problema de los test rápidos es que su sensibilidad suele ser menor que los métodos moleculares de detección del virus. Se han realizado varios estudios que comparan los test inmunocromatográficos con los métodos moleculares, en algunos estudios la sensibilidad de los test no supera el 50 % comparándolo con las técnicas moleculares, mientras que la especificidad fue 100% (Decaro y col, 2012). La sensibilidad tan baja generalmente suele estar relacionada con la baja excreción de virus en heces en estadios tardíos de la infección y/o la presencia de altos niveles de anticuerpos frente a CPV presentes en la pared del intestino, que secuestran las

partículas víricas y no se diseminan en heces (Desario y col., 2005; Decaro y col., 2012). Los test rápidos de detección fecal de antígeno en heces (ELISA), como el diseñado por IDEXX laboratorios, ofrecen una solución rápida y barata. A pesar de su alta especificidad, se han publicado datos muy variables en lo referente a la sensibilidad, desde el 81.8% (Marcovich y col., 2012), 56.2% (Desario y col., 2005), and 18.4% (Schmitz y col., 2009). Los resultados falsos negativos son frecuentes e infradiagnostican la infección por CPV, lo que puede resultar en un tratamiento incorrecto y en la diseminación de la enfermedad (Desario y col., 2005; Schmitz y col., 2009; Decaro y Buonavoglia, 2012; Proksch, A.L. y col, 2015). Se ha postulado que esta baja sensibilidad en estos test es debida a varios factores: mutaciones del virus, eliminación vírico en heces, raza,... Las ventajas de estos test frente a otros métodos es que son fáciles de realizar, de costes asequibles y los resultados son fácilmente interpretables, pero tienen una baja sensibilidad y alta especificidad con respecto a la PCR.

El CPV tiene una tasa de mutación alta, produciéndose múltiples cambios aminoacídicos que dan lugar a las distintas variantes antigénicas. Se ha sugerido en algunos estudios que la última variante detectada y denominada CPV-2c tal vez no sea detectada por los test ELISA existentes en el mercado, demostrándose posteriormente que los mutantes sí que son detectados por el test IDEXX SNAP Parvo (Decaro y col., 2009^a; Proksch, A.L. y col., 2015) y por el test Witness Parvo (Synbiotics Corporation) (Decaro y col., 2013).

Los perros positivos a ELISA tienen una excreción fecal del virus más alta que aquellos negativos. La cantidad excretada de virus en heces parece ser uno de los parámetros que influyen en los resultados del test ELISA (Desario y col., 2005; Proksch, A.L. y col., 2015), comprobándose que si la cantidad de virus presente en heces es pequeña, puede dar lugar a un resultado negativo en el test ELISA. Los animales negativos a test de ELISA parece ser que tienen una concentración fecal de anticuerpos mayor, así como altas concentraciones de anticuerpos en sangre. Las partículas de CPV en las heces se unen a los anticuerpos presentes en las mismas para formar complejos antígeno-anticuerpo, que puede interferir no sólo en los resultados de los test de

detección de antígeno en heces, sino también en las pruebas de hemaglutinación utilizadas para determinar los títulos de anticuerpos en heces.

Otra posibilidad de la baja sensibilidad de estos test puede deberse al tiempo de testase. La excreción fecal de CPV se produce unos 3 – 4 días tras la inoculación (McCartney y col., 1984; Meunier y col., 1985; Proksch, A.L. y col., 2015), con un pico de eliminación a los 4–7 días tras la inoculación (McCartney y col., 1984; Goddard and Leisewitz, 2010). Sin embargo la PCR puede detectar DNA vírico hasta 6 semanas postinfección (Decaro y col., 2005; Goddard and Leisewitz, 2010; Decaro and Buonavoglia, 2012; Proksch, A.L. y col., 2015; Kantere M.C. y col., 2015)

En el presente trabajo, se utilizaron en una primera fase, bien en la consulta veterinaria o a la recepción del animal en la sala de necropsia, un test de inmunocromatografía o un test ELISA para determinar la presencia del parvovirus canino. Todas las muestras, por tanto, fueron testadas, al menos, con un test rápido. En este estudio, se realizó una selección de 42 muestras de animales con sintomatología compatible con CPV, para realizar 4 test inmunocromatográficos frente a Parvovirus, así como un test ELISA; se realizó una comparación estadística entre ellos en dichas muestras, así como con la técnica gold estándar, en este caso, la PCR, determinándose la sensibilidad y especificidad de cada uno de los test.

La sensibilidad obtenida en los distintos test inmunocromatográficos así como en ELISA coincide con estudios previos, siendo muy variable en función del test utilizado. Los valores oscilan entre el 47,2 % de sensibilidad hasta el 95,2 % comparándolos con la técnica de referencia que es la PCR. La especificidad de todos los test utilizados es cercana al 100 %.

Se ha postulado si los test rápidos existentes serían capaces de detectar la nueva variante 2c. En estudios previos realizados con un test rápido ELISA, se han obtenido resultados positivos para 2a, 2b y 2c (Decaro y col, 2009), por lo que se ha supuesto que los test rápidos tanto inmunocromatográficos como ELISA son capaces de detectar las distintas cepas circulantes. Nuestro estudio coincide con estos estudios previos, detectándose tanto CPV-2a, 2b y 2c, así como FPLV debido a reacción cruzada.

La caracterización molecular del CPV-2 proporciona una información muy importante sobre las cepas circulantes en una región en un tiempo concreto y muestra además las asociaciones de estas cepas con las circulantes en otras partes del mundo. En este estudio se ha realizado una selección de muestras de animales positivos a parvovirus canino, para realizar secuenciación mediante PCR convencional y detectar tanto el tipo de cepa vírica circulante como la presencia de mutaciones específicas en las muestras seleccionadas.

El parvovirus canino tiene la capacidad de replicarse en distintos órganos, además del intestino delgado, como el corazón, hígado, riñones, linfonodos y, en ocasiones, en colon (Nho y col. 1997). Se ha demostrado replicación de parvovirus incluso en el epitelio de la lengua (McKnight y col., 2007). El virus se elimina en heces de 5 a 52 días tras la infección (Decaro y col., 2005).

En nuestro estudio se han utilizado tanto muestras fecales de animales que se presentaron con sintomatología compatible con parvovirus en consulta, como muestras de órganos de animales procedentes de la sala de necropsia de la Facultad de Veterinaria de la UCM. Los órganos seleccionados fueron cerebro, linfonodos, corazón, hígado, pulmones, intestino delgado e intestino grueso, encontrando partículas víricas en los animales infectados en todos estos órganos.

Existe una técnica de PCR en tiempo real (rt-PCR), basada en la tecnología Taqman de sondas específicas de hibridación, que ha demostrado ser muy específica, sensible y reproducible, así como más rápida que la PCR convencional (Decaro y col., 2005). Además de detectar y cuantificar el CPV, este tipo de PCR permite la caracterización de la cepa presente en la muestra analizada (2a, 2b y 2c). El gran problema de esta técnica es el alto coste de los equipos y de los reactivos, además para caracterizar nuevas mutaciones es necesario obtener la secuencia de la proteína VP2, total o parcialmente, mediante la PCR convencional y secuenciación del aislado vírico. Por todo ello, en nuestro estudio se decidió realizar PCR convencional, utilizando para ello los primers 555for/555rev (Buonavoglia y col., 2001; Decaro y col., 2005; Hong y col., 2007), que codifican para, al menos, 2 aminoácidos importantes, el residuo 426 y el residuo 555 de la proteína VP2 del genoma del CPV. Estos primers permiten distinguir entre la cepa

original de CPV2, CPV2a, CPV2b y CPV2c, también llamado mutante Glu-426 (Desario y col., 2005, Decaro y col., 2005; Hong y col., 2007; Desario y col., 2012). El residuo 555 permite distinguir entre el parvovirus original y la cepa CPV2a, mediante polimorfismo de un solo nucleótido, G → A, que determina el remplazo del aminoácido Valina en el tipo 2, por el aminoácido Isoleucina en el tipo 2a (Desario y col., 2005).

4. Potencial patógeno de las distintas cepas:

Las mutaciones en VP2 deberían producir un aumento en la patogenicidad de las variantes (Carmichael, 2005; Decaro y col., 2012), aunque no está claro si una variante de CPV2 tiene mayor poder de infección o mayor virulencia que otras. Algunos trabajos con infección experimental de beagles con el CPV 2 original no resultó en signos clínicos severos tal y como aparecen en la enfermedad natural (Pollock, R.V., 1982). Meunier y col. señalaron que el tipo 2 original producía signos clínicos aproximadamente en el 30 % de los beagles infectados. En comparación con la cepa original, se ha descrito que las variantes antigénicas 2a y 2b producen cuadros clínicos más severos (Carmichael, L.E., 2005; Moon, H. S. y col., 2008; Decaro y col., 2012). Los estudios realizados con CPV 2 c parecen contradictorios. Decaro y col en 2005 publicaron un estudio en el que estudiaron 2 camadas de Pastor Alemán con infección natural; por PCR en tiempo real se determinó que la cepa que los afectaba era CPV-2c; estos animales presentaron diarrea mucosa y leucopenia transitoria pero sin hematoquecia ni vómitos y todos ellos se recuperaron en unos días. Los hallazgos en otros estudios son muy diferentes: Spibey y colaboradores, en 2008, realizan una infección experimental de beagles con una cepa de campo de CPV-2c. Los 6 animales del estudio enfermaron gravemente y 3 de ellos fueron eutanasiados debido a la gravedad del cuadro clínico. Por todos estos estudios, parece razonable pensar que las variantes de CPV pueden no determinar su patogenicidad, sino que ésta dependerá sobre todo de la edad del animal, el estado de su sistema inmune, factores de estrés concomitantes,...

Esta especulación está respaldada por Decaro y colaboradores en 2007, que encuentran patrones similares de distribución tisular en todos los perros examinados, independientemente de la variante antigénica que produzca la enfermedad.

En el presente estudio, se detectaron animales con la sintomatología típica digestiva descrita, pero se ha descrito también sintomatología respiratoria y/o neurológica acompañando a la típica digestiva; un 9,8 % de los animales presentaron sintomatología respiratoria asociada a la digestiva, y un 5,4 % de los animales sintomatología neurológica, asociada también a la digestiva. Dentro del grupo de animales positivos a PCR que presentaron la sintomatología típica digestiva, la mayoría de animales presentaron vómitos y diarrea leve sin hematoquecia, independientemente o no de que la evolución de su cuadro clínico fuera positivo o negativo.

En cuanto a las muestras en las que se ha secuenciado la cepa vírica, la mayoría de los animales en los que se secuenció la cepa CPV-2a como la CPV-2b presentaron un cuadro de gastroenteritis, con vómitos y diarrea sin hematoquecia. Sin embargo, la mitad de los animales en los que se presenta la cepa CPV-2c presentaron un cuadro gastroentérico más severo, con vómitos que no responden al tratamiento y diarrea hemorrágica incoercible. Estos datos sugieren que la cepa CPV-2c parece tener mayor potencial patógeno en algunos casos.

En los 2 animales de la especie canina en los que se ha encontrado FLPV la sintomatología ha sido la típica digestiva descrita, con vómitos y hematoquecia, produciéndose en uno de los casos la muerte del animal. Esto contrasta con los estudios anteriormente mencionados en los que se describe que el FLPV en perros se replica en perros en el timo y médula ósea y se supone que no se excreta por heces (Truyen, 2006; Decaro y col., 2012). En los 2 casos en los que se ha detectado el virus, ha sido aislado y secuenciado a partir de muestras de heces de los pacientes caninos.

En cuanto a los pacientes con otro tipo de síntomas además de los digestivos, las 3 cepas CPV-2a, 2b y 2c presentan el mismo número de casos con sintomatología respiratoria asociada. En el caso de la sintomatología neurológica asociada, sólo ha aparecido la misma en animales con cepas CPV-2a y 2c, no encontrando ningún caso en la cepa 2b. Hemos descrito también animales asintomáticos que excretan virus en heces, de los que se supone que pueden comportarse como portadores y transmisores

de la enfermedad, coincidiendo con estudios realizados por Decaro y col en 2005 y 2012.

5. Factores de riesgo asociados a la presentación clínica de CPV:

5.1. Edad:

En cuanto a la edad de presentación de la enfermedad, el parvovirus canino ha sido una enfermedad típicamente descrita en cachorros, principalmente de 4 -12 semanas de edad, cuando está disminuyendo su inmunidad maternal (Greene, 2012; Decaro y col., 2012). Se ha descrito que los adultos son resistentes a la infección por CPV debido a que disminuye la susceptibilidad al virus con la edad y a la presencia de inmunidad específica, inducida por la vacunación o por infecciones previas (generalmente subclínicas). En los últimos años se han publicado casos de CPV en animales adultos, generalmente vacunados, todos ellos afectados por CPV-2c (Cavalli y col., 2001; Decaro y col., 2008; Decaro y col., 2009) y con enfermedad severa, produciéndose la muerte del animal en uno de los casos.

En el presente estudio, el 74 % de los animales se encuentra en la edad típica de presentación descrita en los estudios previos; el 39 % son cachorros menores de 8 semanas de edad y el 34 % son animales entre 9 y 16 semanas. Nuestros datos coinciden también con los últimos estudios publicados por Cavalli y col. en 2001 y; Decaro y col. en 2009, ya que el 14 % de los animales positivos a CPV son mayores de 9 meses de edad, encontrando animales de 1, 2, 3, 7 y 10 años. En estos últimos se ha encontrado todos los tipos de CPV, así como FLPV, contrastando con los estudios previos en los que se había encontrado solamente CPV-2c.

5.2. Raza de los animales:

En estudios previos se han descrito que las razas predispuestas a padecer esta enfermedad son: Rottweiler, American Pit Bull Terrier, Doberman Pinscher y Pastor alemán (Glickman y col. 1985; Houston y col., 1996; Iris Kalli y col., 2010; Ling M. y col., 2012; Brady, S. y col., 2012; Proksch, A.L. y col., 2015), aunque las causas de esta

susceptibilidad no han sido totalmente aclaradas. Parece que estas razas pueden tener un fallo en el sistema inmunitario o que la inmunidad maternal sea más prolongada, por lo que pueden existir fallos vacunales que hagan que no queden correctamente inmunizados. En nuestro estudio, contrastando con los estudios previos, la raza más abundante ha sido Yorkshire terrier, seguida de Bulldog Francés. Otras razas con presencia importante en el estudio han sido Teckel, Galgo y Labrador Retriever. La variabilidad de raza en la que se ha presentado la enfermedad puede estar debida a factores socioeconómicos y culturales; en nuestro caso se han tomado muestras tanto de zonas rurales, donde la presencia de cazadores con galgos es bastante abundante, así como de zonas urbanas, donde el Yorkshire terrier es una raza muy frecuente. Además existen determinadas razas que sufren modas pasajeras, siendo más abundante su presencia en determinados años; en los últimos años el bulldog francés ha sido una raza que se ha puesto “de moda”, de ahí la presencia de un número tan abundante de ellos en el estudio.

5.3. Sexo:

Según estudios publicados (Glickman y col. 1985; Houston y col., 1996; Iris Kalli y col., 2010; Ling M. y col., 2012; Brady, S. y col., 2012), no se ha encontrado una relación directa en cuanto al sexo del animal y su predisposición a padecer CPV. En el presente estudio se han obtenido los mismos resultados que en estudios anteriores, siendo el porcentaje de machos y de hembras infectados muy similar en ambos casos.

5.4. Vacunación:

Existe controversia en cuanto a la eficacia de las vacunas actuales y la respuesta inmune protectora que inducen frente a los a las nuevas variantes antigénicas de CPV2. Como ya hemos mencionado anteriormente, algunos estudios afirman que las vacunas tradicionales con las variantes originales protegen contra las nuevas cepas circulantes. Otros estudios demuestran una baja reacción cruzada de anticuerpos in vitro entre la cepa original y las nuevas variantes (Puentes, 2012).

En la respuesta inmune generada frente a CPV generada por una vacuna influyen varios factores. Entre los factores relacionados con la vacuna, influyen la viabilidad del virus, el título vírico de la misma, si el virus se presenta atenuado o inactivado, las propiedades antigénicas de las cepas incluidas en la vacuna así como la vía de administración (De Cramer y col., 2010). Por otra parte, existen factores en el propio animal que incluyen en su respuesta vacunal, como su estado sanitario y la presencia de anticuerpos maternos. Los anticuerpos maternos pueden interferir en la respuesta inmune frente a la vacunación, por lo que los protocolos vacunales en cachorros han sido muy discutidos (Pollock y Carmichael, 1982; Lida y col., 1990; Pratelli y col., 2000; Day, 2007). En ausencia de anticuerpos maternos, que producen inhibición, los cachorros desarrollan una respuesta inmune temprana efectiva (Day, 2007). Un título de anticuerpos maternos igual o mayor a 1:20, interfiere con la respuesta inmune del cachorro tras la administración de la vacuna, dejando a los cachorros susceptibles a la infección, pero no confiere protección frente a las cepas de campo circulantes (Pollock y Carmichael, 1982). Este periodo en el que los anticuerpos maternos influyen en la vacunación se denomina “ventana de interferencia”, que suele estar entre los 40 y 69 días de edad en los cachorros (Lida y col., 1990). Este periodo es variable, ya que depende de la transferencia de inmunidad por parte de la madre, así como de las cepas a las que estén expuestos los cachorros. Existen estudios que han demostrado la disminución de anticuerpos maternos en sangre más rápido cuando el cachorro se expone al virus (McCartney y col., 1988). Por ello, se aconseja una primera vacunación a edad temprana para intentar reducir esta ventana de interferencia. Aun así, los protocolos vacunales siguen siendo controvertidos.

Dentro de los animales que se encuentran en esta ventana de interferencia de la que hemos hablado, el 41 % presenta una dosis vacunal de parvovirus a los 45 días de edad aproximadamente, por lo que, o bien los anticuerpos maternos interfirieron en esta primera vacunación, o la protección que ofreció la misma no fue suficiente o adecuada frente a la infección por CPV-2. En los animales de 2,1 a 4 meses de edad, el 64 % de animales se encontraban vacunados frente a CPV-2c, reafirmando las teorías expuestas anteriormente. En los siguientes grupos de edad se siguen encontrando

datos similares, estando la mayoría de animales enfermos vacunados frente a CPV (el 83 % en el grupo de 4,1 a 9 meses y el 60 % en animales mayores de 9 meses).

En cuanto a la protección cruzada de las vacunas actuales contra las nuevas variantes de virus, existen controversias en los trabajos publicados, ya que el genotipo original de Parvovirus canino (CPV-2) ya no se detecta en infecciones naturales aunque es todavía utilizado en multitud de vacunas comercializadas frente a CPV. Hay estudios que afirman que las vacunas actuales protegen frente a las nuevas cepas (Pratelli y col., 2001; Spibey y col., 2008; Siedek y col., 2011) encontrando un título de anticuerpos neutralizante en los animales vacunados suficiente como para proteger tanto frente a virus homólogo al de la vacuna, como heterólogo. En otros estudios se ha demostrado que los anticuerpos que se han producido en perros vacunados con cepa CPV-2 no han sido eficaces frente a infección con aislados circulantes actualmente (En el estudio que nos ocupa, la mayoría de animales se encontraban parcial o totalmente vacunados frente a CPV (57%), frente al 36 % que no disponía de ninguna dosis vacunal).

Nuestro trabajo coincide con los estudios realizados por Ohshima y col., 2008; Pérez y col., 2007; Puentes y col., 2011 y Calderón y col., 2011, en los que se postula que las vacunas no confieren una adecuada inmunidad frente a las cepas actuales. En el presente estudio, el 71,42 % de los animales con CPV-2a, el 50 % de los animales con CPV-2b y el 63,6 % de animales con CPV-2c se encontraba total o parcialmente vacunado frente a esta enfermedad.

En el caso de los 2 perros en los que se detectó infección por virus de la panleucopenia felina, ambos se encontraban vacunados con un protocolo completo frente a CPV y eran animales adultos, por lo que podemos suponer que en estos animales no se produjo una protección cruzada frente a FLPV.

6. Parvovirus en otras especies:

Se han incluido en este estudio, además de las muestras de la especie canina, las siguientes muestras:

- 5 muestras de heces felinas procedentes de animales con diarrea con resultado positivo.
- 2 muestras intestinales de dos hurones (*Mustela putorius furo*) remitidas para diagnóstico postmortem, desde el Departamento de Anatomía Patológica del HCV (UCM), con resultado positivo.
- 1 muestra de tejido intestinal de un ejemplar de panda rojo (*Ailurus fulgens*) remitida con idéntico objetivo, con resultado positivo.

6.1. Parvovirus felino (Panleucopenia Felina):

En estudios previos se ha demostrado que el CPV2 se replica en cultivos celulares felinos pero no en gatos (Truyen y col., 1996). Otros estudios indican que un virus similar a CPV-2a se aisló en 1992 y sí que se replicaba en gatos enfermos con sintomatología compatible con parvovirus (Gofu, H. y col, 1984; Mochizuki y col., 1993; Truyen y col., 1996). En estudios posteriores demostraron que CPV puede afectar a felinos y producir enfermedad clínica (Truyen y col., 1996).

Los aislados de CPV y FPV difieren en menos del 2 % en sus secuencias de DNA y son antigénicamente muy similares (Truyen y Parrish, 1992)-

El rango de hospedadores in vivo no está bien definido. CPV ha sido aislado de perros domésticos, lobos y coyotes, así como otros miembros de la familia canidae (Truyen y Parrish, 1992). FPV se ha aislado en gatos (y en muchos miembros de la familia felidae), así como en mapaches, visones y zorros. Se sabe poco del rango de hospedador heterólogo. Hay estudios que sugieren que FPV puede replicarse en perros pero no se elimina en heces. No existen muchos estudios sobre infección por CPV en gatos. En los últimos realizados se ha aislado tanto FLPV como CPV de gatos sanos y enfermos. En Alemania se ha detectado CPV en el 10 % de los gatos enfermos; sin embargo, en el sudeste asiático, casi el 80 % de los gatos enfermos están infectados por CPV y no por FLPV (Stuelzer y Hartmann, 2014).

En nuestro estudio se han secuenciado 2 de las 5 muestras felinas incluidas en el total de muestras, correspondiéndose una de ellas con un CPV-2a. No se puede establecer si en nuestro país la mayoría de los gatos están infectados por FPLV o por una de las cepas de CPV ya que la muestra estudiada ha sido tan solo de 2 casos. Por la misma circunstancia no se puede establecer si CPV-2c infecta o no a los felinos en nuestro país.

6.2. Parvovirus en hurones:

Los hurones afectados clínicamente por parvovirus son diagnosticados en su mayoría de enfermedad aleutiana. Este parvovirus afecta a la familia de los mustélidos, como por ejemplo hurones y visones. Se describió por primera vez en la década de los 40 del siglo pasado, en los EEUU en granjas de visones. Está producida por un parvovirus genética y antigénicamente muy diferente de los pertenecientes al subgrupo de los parvovirus felinos (Murphy y col., 1985; Steinell y col., 2001). Parris y col., en 1987, realizaron un estudio de patogenicidad en hurones y visones del virus de la panleucopenia felina, el parvovirus canino, el parvovirus de los mapaches y virus de la enteritis de los visones. En hurones sólo se aislaron FPLV y parvovirus de los mapaches, no encontrándose ningún animal afectado por CPV.

En nuestro estudio se han incluido 2 hurones diagnosticados inicialmente de enfermedad aleutiana, positivos ambos tanto a test rápidos como a PCR para CPV. Se ha secuenciado la muestra perteneciente a uno de estos hurones, clasificándose la cepa encontrada como CPV-2a.

6.3. Parvovirus en carnívoros salvajes:

Se han realizado estudios para determinar las cepas circulantes de parvovirus en carnívoros salvajes. En EEUU se ha comprobado que tanto las 3 cepas de CPV como FLPV circulan entre los carnívoros salvajes (Allison y col., 2013), en Europa sólo se han detectado hasta el momento FPLV y CPV-2b (Battilani y col., 2001; Steinell y col., 2001; Barlow y col., 2012; Duarte y col., 2013).

En un estudio previo realizado en un panda rojo en China (Qin y col., 2007), se secuenció una cepa CPV-2a. En nuestro estudio se ha incluido un caso clínico de un

panda rojo criado artificialmente en el zoo de Madrid, con presentación de sintomatología clínica neurológica y respiratoria al mes de edad, siendo positivo a los test inmunocromatográficos para CPV, secuenciándose en este caso una cepa CPV-2a, al igual que en el estudio nombrado anteriormente.

VIII: CONCLUSIONES

VIII. Conclusiones:

1. La concordancia de resultados de los cinco test rápidos de detección de virus en muestras biológica comparados para elegir la mejor prueba posible de uso rutinario fue baja.
2. Los resultados de la técnica de PCR utilizada en este estudio como técnica de referencia confirmaron la precisión del test rápido de uso seleccionado (sensibilidad 95,2% y especificidad 100%)
3. La mayoría de los virus aislados “in vitro”, con independencia de la variante a que pertenecieran, fueron capaces de crecer tanto en líneas celulares de origen canino como de origen felino
4. La tipificación de virus realizada indica que la distribución de cepas circulantes en nuestro país es semejante a la otros países de nuestro entorno, siendo el tipo 2 a el más frecuente.
5. Los resultados de nuestro estudio confirman la presencia de CPV-2c en nuestro país al menos desde el año 2004, fecha anterior a la comunicada por distintos autores que datan la circulación general de esta variante a partir del año 2006.
6. Se ha detectado la presencia de Parvovirus en heces de animales asintomáticos, hecho que podría tener relevancia epidemiológica para el mantenimiento de la circulación vírica en la población y la aparición de nuevas variantes.
7. El 57% de los animales positivos con signos de parvovirus canina habían sido previamente inmunizados con al menos una dosis de vacuna, lo que cuestionaría la eficacia de las vacunas empleadas para el control de la enfermedad.

8. Un 14 % de los casos estudiados correspondió a animales considerados adultos. Esto confirmaría etiológicamente el cambio en el comportamiento epidemiológico de la enfermedad en función de la edad
9. Los resultados obtenidos a partir de muestras tanto caninas como de otras especies indican escasa restricción de hospedador ya que dos muestras caninas contenían virus Panleucopenia felina y una de las dos muestras felinas secuenciadas se identificó como Parvovirus canino tipo 2 a Esta misma variante se identificó en un panda rojo (*Ailurus fulgens*) y en un hurón (*Mustela putorius furo*)

IX. BIBLIOGRAFÍA

IX. BIBLIOGRAFÍA:

Abd-Eldaim, M., et al. (2009). "Detection of feline panleukopenia virus using a commercial ELISA for canine parvovirus." *Vet Ther* 10(4): E1-6.

Abdelmagid, O. Y., et al. (2004). "Evaluation of the efficacy and duration of immunity of a canine combination vaccine against virulent parvovirus, infectious canine hepatitis virus, and distemper virus experimental challenges." *Vet Ther* 5(3): 173-186.

Ackermann, O. (1981). "[Laboratory diagnosis of distemper, canine infectious hepatitis and parvovirus infection in dogs]." *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 94(8): 147-150.

Agungpriyono, D. R., et al. (1999). "Subacute massive necrotizing myocarditis by canine parvovirus type 2 infection with diffuse leukoencephalomalacia in a puppy." *Vet Pathol* 36(1): 77-80.

Aldaz, J., et al. (2013). "High local genetic diversity of canine parvovirus from Ecuador." *Vet Microbiol* 166(1-2): 214-219.

Anderson, K., et al. (2014). "Duration of immunity in red wolves (*Canis rufus*) following vaccination with a modified live parvovirus and canine distemper vaccine." *J Zoo Wildl Med* 45(3): 550-554.

Appel, M. J., et al. (1980). "Canine parvovirus vaccination." *Mod Vet Pract* 61(12): 983-985.

Appel, M. J. and C. R. Parrish (1982). "Raccoons are not susceptible to canine parvovirus." *J Am Vet Med Assoc* 181(5): 489.

Arnett, A. L., et al. (2011). "Immune Responses to rAAV6: The Influence of Canine Parvovirus Vaccination and Neonatal Administration of Viral Vector." *Front Microbiol* 2: 220.

Atkinson, M. (2006). "Canine parvovirus vaccination." *Vet Rec* 159(26): 895; author reply 895-896.

Atkinson, M. (2006). "Efficacy of vaccination against canine parvovirus." *Vet Rec* 159(13): 428; discussion 428.

Atwell, R. B. and W. R. Kelly (1980). "Canine parvovirus: a cause of chronic myocardial fibrosis and adolescent congestive heart failure." *J Small Anim Pract* 21(11): 609-620.

Azetaka, M., et al. (1981). "Studies on canine parvovirus isolation, experimental infection and serologic survey." *Nihon Juigaku Zasshi* 43(2): 243-255.

Baatz, G. (1992). "[Ten years of clinical experiences with canine parvovirus infection CPV-2 infection]." *Tierarztl Prax* 20(1): 69-78.

Baba, M., et al. (1981). "[Canine parvovirus infection in a group of beagles (author's transl)]." *Jikken Dobutsu* 30(2): 141-144.

Bagshaw, C., et al. (2014). "Molecular detection of canine parvovirus in flies (Diptera) at open and closed canine facilities in the eastern United States." *Prev Vet Med* 114(3-4): 276-284.

banse, H. E., et al. (2008). "Assessment of serum antibody titers against canine distemper virus, canine adenovirus type II, and canine parvovirus in Alaskan sled dogs before and after a long-distance race." *J Am Vet Med Assoc* 232(11): 1669-1673.

Barbis, D. P., et al. (1992). "Mutations adjacent to the dimple of the canine parvovirus capsid structure affect sialic acid binding." *Virology* 191(1): 301-308.

Barbis, D. P. and C. R. Parrish (1994). "Characterization of canine parvovirus (CPV) interactions with 3201 T cells: involvement of GPI-anchored protein(s) in binding and infection." *Braz J Med Biol Res* 27(2): 401-407.

Barker, I. K., et al. (1983). "Response of mink, skunk, red fox and raccoon to inoculation with mink virus enteritis, feline panleukopenia and canine parvovirus and prevalence of antibody to parvovirus in wild carnivores in Ontario." *Can J Comp Med* 47(2): 188-197.

Basak, S. and R. W. Compans (1989). "Polarized entry of canine parvovirus in an epithelial cell line." *J Virol* 63(7): 3164-3167.

- Basak, S. and H. Turner (1992). "Infectious entry pathway for canine parvovirus." *Virology* 186(2): 368-376.
- Basak, S., et al. (1994). "Identification of a 40- to 42-kDa attachment polypeptide for canine parvovirus in A72 cells." *Virology* 205(1): 7-16.
- Bass, E. P., et al. (1982). "Development of a modified live, canine origin parvovirus vaccine." *J Am Vet Med Assoc* 181(9): 909-913.
- Bastianello, S. S. (1981). "Canine parvovirus myocarditis: clinical signs and pathological lesions encountered in natural cases." *J S Afr Vet Assoc* 52(2): 105-108.
- Battilani, M., et al. (2013). "Co-infection with feline and canine parvovirus in a cat." *Vet Ital* 49(1): 127-129.
- Battilani, M., et al. (2002). "Genetic analysis of canine parvovirus isolates (CPV-2) from dogs in Italy." *Virus Res* 83(1-2): 149-157.
- Battilani, M., et al. (2007). "Co-infection with multiple variants of canine parvovirus type 2 (CPV-2)." *Vet Res Commun* 31 Suppl 1: 209-212.
- Battilani, M., et al. (2006). "High genetic diversity of the VP2 gene of a canine parvovirus strain detected in a domestic cat." *Virology* 352(1): 22-26.
- Battilani, M., et al. (2001). "Analysis of canine parvovirus sequences from wolves and dogs isolated in Italy." *J Gen Virol* 82(Pt 7): 1555-1560.
- Bauder, B., et al. (2000). "Apoptosis in feline panleukopenia and canine parvovirus enteritis." *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 47(10): 775-784.
- Becker, G. and H. H. Kramer (1983). "[Course and reflections on canine parvovirus enteritis in the Berlin area]." *Arch Exp Veterinarmed* 37(2): 303-307.
- Berentsen, A. R., et al. (2013). "Rabies, canine distemper, and canine parvovirus exposure in large carnivore communities from two Zambian ecosystems." *Vector Borne Zoonotic Dis* 13(9): 643-649.

Bergman, J. G., et al. (2006). "Comparative trial of the canine parvovirus, canine distemper virus and canine adenovirus type 2 fractions of two commercially available modified live vaccines." *Vet Rec* 159(22): 733-736.

Bingga, G., et al. (2014). "High resolution melting curve analysis as a new tool for rapid identification of canine parvovirus type 2 strains." *Mol Cell Probes* 28(5-6): 271-278.

Blunt, M. H. (1980). "Canine parvovirus infection." *N Z Vet J* 28(12): 267.

Bodeus, M., et al. (1988). "A latex agglutination test for the detection of canine parvovirus and corresponding antibodies." *J Virol Methods* 19(1): 1-12.

Bohm, M., et al. (2004). "Serum antibody titres to canine parvovirus, adenovirus and distemper virus in dogs in the UK which had not been vaccinated for at least three years." *Vet Rec* 154

Brady, S., et al. (2012). "Canine parvovirus in Australia: the role of socio-economic factors in disease clusters." *Vet J* 193(2): 522-528.

Bragg, R. F., et al. (2012). "Clinical evaluation of a single dose of immune plasma for treatment of canine parvovirus infection." *J Am Vet Med Assoc* 240(6): 700-704.

Brock, K. V., et al. (1989). "Effect of canine parvovirus on erythroid progenitors in phenylhydrazine-induced regenerative hemolytic anemia in dogs." *Am J Vet Res* 50(6): 965-969.

Buonavoglia, C., et al. (1994). "Intranasal vaccination of pups with maternally derived antibodies with a modified live canine parvovirus." *Zentralbl Veterinarmed B* 41(1): 3-8.

Buonavoglia, C., et al. (1995). "Intranasal vaccination of pups in the presence of maternally derived antibodies to canine parvovirus (CPV). Evaluation of minimal immunizing dose." *New Microbiol* 18(4): 371-375.

Buonavoglia, C., et al. (1983). "Dog response to plaque variant of canine parvovirus." *Zentralbl Veterinarmed B* 30(7): 526-531.

- Buonavoglia, C., et al. (1986). "Experimental infection of red fox with canine parvovirus." *Zentralbl Veterinarmed B* 33(8): 597-600.
- Buonavoglia, C., et al. (2001). "Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy." *J Gen Virol* 82(Pt 12): 3021-3025.
- Buonavoglia, C., et al. (1992). "Response of pups with maternal derived antibody to modified-live canine parvovirus vaccine." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 15(4): 281-283.
- Buonavoglia, D., et al. (2000). "Antigenic analysis of canine parvovirus strains isolated in Italy." *New Microbiol* 23(1): 93-96.
- Burtonboy, S., et al. (1991). "Performance of high titre attenuated canine parvovirus vaccine in pups with maternally derived antibody." *Vet Rec* 128(16): 377-381.
- Busch, T. J. (1981). "Canine parvovirus infection." *N Z Vet J* 29(1-2): 20.
- Calderon, M. G., et al. (2009). "Molecular characterization of canine parvovirus strains in Argentina: Detection of the pathogenic variant CPV2c in vaccinated dogs." *J Virol Methods* 159(2): 141-145.
- Calderon, M. G., et al. (2011). "Evolution of canine parvovirus in Argentina between years 2003 and 2010: CPV2c has become the predominant variant affecting the domestic dog population." *Virus Res* 157(1): 106-110.
- Cameron, R., et al. (1997). "The removal of model viruses, poliovirus type 1 and canine parvovirus, during the purification of human albumin using ion-exchange chromatographic procedures." *Biologicals* 25(4): 391-401.
- Carman, P. S. and R. C. Povey (1980). "Experimental challenge of dogs with canine parvovirus-2." *Vet Rec* 107(19): 447.
- Carman, P. S. and R. C. Povey (1983). "Comparison of the viral proteins of canine parvovirus-2, mink enteritis virus and feline panleukopenia virus." *Vet Microbiol* 8(5): 423-435.

- Carman, P. S. and R. C. Povey (1984). "The seroprevalence of canine parvovirus-2 in a selected sample of the canine population in ontario." *Can Vet J* 25(6): 259-262.
- Carman, P. S. and R. C. Povey (1985). "Pathogenesis of canine parvovirus-2 in dogs: haematology, serology and virus recovery." *Res Vet Sci* 38(2): 134-140.
- Carman, P. S. and R. C. Povey (1985). "Pathogenesis of canine parvovirus-2 in dogs: histopathology and antigen identification in tissues." *Res Vet Sci* 38(2): 141-150.
- Carman, S. and C. Povey (1982). "The failure of an inactivated mink enteritis virus vaccine in four preparations to provide protection to dogs against challenge with canine parvovirus-2." *Can J Comp Med* 46(1): 47-50.
- Carman, S. and C. Povey (1982). "Successful experimental challenge of dogs with canine parvovirus-2." *Can J Comp Med* 46(1): 33-38.
- Carmichael, L. E. (2005). "An annotated historical account of canine parvovirus." *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52(7-8): 303-311.
- Carmichael, L. E., et al. (1980). "Hemagglutination by canine parvovirus: serologic studies and diagnostic applications." *Am J Vet Res* 41(5): 784-791.
- Carmichael, L. E., et al. (1981). "A modified live canine parvovirus strain with novel plaque characteristics. I. Viral attenuation and dog response." *Cornell Vet* 71(4): 408-427.
- Carmichael, L. E., et al. (1983). "A modified live canine parvovirus vaccine. II. Immune response." *Cornell Vet* 73(1): 13-29.
- Carmichael, L. E., et al. (1984). "Response of puppies to canine-origin parvovirus vaccines." *Mod Vet Pract* 65(2): 99-102.
- Carmichael, L. E., et al. (1994). "Minute virus of canines (MVC, canine parvovirus type-1): pathogenicity for pups and seroprevalence estimate." *J Vet Diagn Invest* 6(2): 165-174.

- Casal, J. I., et al. (1995). "Peptide vaccine against canine parvovirus: identification of two neutralization subsites in the N terminus of VP2 and optimization of the amino acid sequence." *J Virol* 69(11): 7274-7277.
- Castro, T. X., et al. (2010). "Partial VP2 sequencing of canine parvovirus (CPV) strains circulating in the state of Rio de Janeiro, Brazil: detection of the new variant CPV-2c." *Braz J Microbiol* 41(4): 1093-1098.
- Castro, T. X., et al. (2011). "Monitoring of canine parvovirus (CPV) strains detected in vaccinated puppies in Brazil." *Res Vet Sci* 90(2): 336-340.
- Cavalli, A., et al. (2001). "Characterization of a canine parvovirus strain isolated from an adult dog." *New Microbiol* 24(3): 239-242.
- Cavalli, A., et al. (2014). "Detection and genetic characterization of Canine parvovirus and Canine coronavirus strains circulating in district of Tirana in Albania." *J Vet Diagn Invest* 26(4): 563-566.
- Cavalli, A., et al. (2008). "Evaluation of the antigenic relationships among canine parvovirus type 2 variants." *Clin Vaccine Immunol* 15(3): 534-539.
- Chang, S. F., et al. (1992). "Multiple amino acids in the capsid structure of canine parvovirus coordinately determine the canine host range and specific antigenic and hemagglutination.
- Chapek, M. L., et al. (1980). "Efficiency and safety of an inactivated feline parvovirus vaccine against canine parvovirus infection." *Mod Vet Pract* 61(3): 261-263.
- Chapman, M. S. and M. G. Rossmann (1995). "Single-stranded DNA-protein interactions in canine parvovirus." *Structure* 3(2): 151-162.
- Chapman, M. S. and M. G. Rossmann (1996). "Structural refinement of the DNA-containing capsid of canine parvovirus using RSRef, a resolution-dependent stereochemically restrained real-space refinement method." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 52(Pt 1): 129-142.

- Chinchkar, S. R., et al. (2006). "Analysis of VP2 gene sequences of canine parvovirus isolates in India." *Arch Virol* 151(9): 1881-1887.
- Cho, H. S., et al. (2006). "Detection of canine parvovirus in fecal samples using loop-mediated isothermal amplification." *J Vet Diagn Invest* 18(1): 81-84.
- Churchill, A. E. (1982). "Vaccination against canine parvovirus disease." *Vet Rec* 110(14): 344.
- Churchill, A. E. (1987). "Preliminary development of a live attenuated canine parvovirus vaccine from an isolate of British origin." *Vet Rec* 120(14): 334-339.
- Clegg, S. R., et al. (2012). "Canine parvovirus in asymptomatic feline carriers." *Vet Microbiol* 157(1-2): 78-85.
- Clegg, S. R., et al. (2011). "Molecular epidemiology and phylogeny reveal complex spatial dynamics in areas where canine parvovirus is endemic." *J Virol* 85(15): 7892-7899.
- Cooper, B. J., et al. (1979). "Canine viral enteritis. II. Morphologic lesions in naturally occurring parvovirus infection." *Cornell Vet* 69(3): 134-144.
- Corcoran, B. (1984). "Canine parvovirus vaccination." *Vet Rec* 114(9): 228.
- Cormie, J. L. (1980). "Canine parvovirus infection." *Vet Rec* 107(10): 233-234.
- Cortes, E., et al. (1993). "Topographical analysis of canine parvovirus virions and recombinant VP2 capsids." *J Gen Virol* 74 (Pt 9): 2005-2010.
- Costa, A. P., et al. (2005). "Genomic typing of canine parvovirus circulating in the State of Rio de Janeiro, Brazil from 1995 to 2001 using polymerase chain reaction assay." *Vet Res Commun* 29(8): 735-743.
- Courtenay, O., et al. (2001). "Contact rates between wild and domestic canids: no evidence of parvovirus or canine distemper virus in crab-eating foxes." *Vet Microbiol* 81(1): 9-19.

Coyne, M. J. (2000). "Efficacy of two canine parvovirus vaccines for inducing seroconversion in Rottweiler and Doberman pinscher pups with various levels of maternally derived antibodies." *Vet Ther* 1(1): 35-42.

Coyne, M. J. (2000). "Seroconversion of puppies to canine parvovirus and canine distemper virus: a comparison of two combination vaccines." *J Am Anim Hosp Assoc* 36(2): 137-142.

Cureton, D. K., et al. (2012). "Limited transferrin receptor clustering allows rapid diffusion of canine parvovirus into clathrin endocytic structures." *J Virol* 86(9): 5330-5340.

Dahiya, S. S., et al. (2011). "An oral Sindbis virus replicon-based DNA vaccine containing VP2 gene of canine parvovirus delivered by *Escherichia coli* elicits immune responses in dogs." *Acta Virol* 55(4): 289-294.

Davies, M. (2007). "Canine parvovirus strains in the UK." *Vet Rec* 160(12): 416.

Davies, M. (2008). "Canine parvovirus strains identified from clinically ill dogs in the United Kingdom." *Vet Rec* 163(18): 543-544.

De Cramer, K. G., et al. (2011). "Efficacy of vaccination at 4 and 6 weeks in the control of canine parvovirus." *Vet Microbiol* 149(1-2): 126-132.

de Ybanez, R. R., et al. (1995). "Identification of types of canine parvovirus circulating in Spain." *Vet Rec* 136(7): 174-175.

Decaro, N., et al. (2002). "Evaluation of the innate immune response in pups during canine parvovirus type 1 infection." *New Microbiol* 25(3): 291-298.

Decaro, N. and C. Buonavoglia (2012). "Canine parvovirus--a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c." *Vet Microbiol* 155(1): 1-12.

Decaro, N., et al. (2010). "Characterisation of canine parvovirus strains isolated from cats with feline panleukopenia." *Res Vet Sci* 89(2): 275-278.

Decaro, N., et al. (2005). "Maternally-derived antibodies in pups and protection from canine parvovirus infection." *Biologicals* 33(4): 261-267.

Decaro, N., et al. (2014). "Long-term viremia and fecal shedding in pups after modified-live canine parvovirus vaccination." *Vaccine* 32(30): 3850-3853.

Decaro, N., et al. (2007). "The study molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe."

Decaro, N., et al. (2011). "Canine parvovirus type 2c infection in a kitten associated with intracranial abscess and convulsions." *J Feline Med Surg* 13(4): 231-236.

Decaro, N., et al. (2013). "Detection of a canine parvovirus type 2c with a non-coding mutation and its implications for molecular characterisation." *Vet J* 196(3): 555-557.

Decaro, N., et al. (2010). "Detection of canine parvovirus type 2c by a commercially available in-house rapid test." *Vet J* 184(3): 373-375.

Decaro, N., et al. (2013). "Evaluation of an in-clinic assay for the diagnosis of canine parvovirus." *Vet J* 198(2): 504-507.

Decaro, N., et al. (2004). "Evaluation of lactogenic immunity to canine parvovirus in pups." *New Microbiol* 27(4): 375-379.

Decaro, N., et al. (2005). "Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant." *J Vet Diagn Invest* 17(2): 133-138.

Decaro, N., et al. (2007). "Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: a clinical and laboratory diagnostic dilemma." *Vaccine* 25(7): 1161-1166.

Decaro, N., et al. (2008). "Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c." *New Microbiol* 31(1): 125-130.

Decaro, N., et al. (2005). "New approaches for the molecular characterization of canine parvovirus type 2 strains." *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52(7-8): 316-319.

Decaro, N., et al. (2006). "A minor groove binder probe real-time PCR assay for discrimination between type 2-based vaccines and field strains of canine parvovirus." *J Virol Methods* 136(1-2): 65-70.

Decaro, N., et al. (2006). "Characterisation of the canine parvovirus type 2 variants using minor groove binder probe technology." *J Virol Methods* 133(1): 92-99.

Decaro, N., et al. (2005). "A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs." *Vet Microbiol* 105(1): 19-28.

Decaro, N., et al. (2006). "First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain." *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53(10): 468-472.

Decaro, N., et al. (2007). "Tissue distribution of the antigenic variants of canine parvovirus type 2 in dogs." *Vet Microbiol* 121(1-2): 39-44.

Demeter, Z., et al. (2010). "Misleading results of the MbolI-based identification of type 2a canine parvovirus strains from Hungary reacting as type 2c strains." *Virus Genes* 41(1): 37-42.

Desario, C., et al. (2005). "Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus?" *J Virol Methods* 126(1-2): 179-185.

Dogonyaro, B. B., et al. (2013). "Genetic analysis of the VP2-encoding gene of canine parvovirus strains from Africa." *Vet Microbiol* 165(3-4): 460-465.

Dohse, K. and R. Rudolph (1988). "[Antigen localization in canine parvovirus type 2 infection using the avidin-biotin complex method (ABC) and direct immunofluorescence]." *Zentralbl Veterinarmed B* 35(10): 717-728.

Doki, M., et al. (2006). "Sequence analysis of VP2 gene of canine parvovirus isolated from domestic dogs in Japan in 1999 and 2000." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 29(4): 199-206.

- Doley, J., et al. (2014). "Canine parvovirus type 2a (CPV-2a)-induced apoptosis in MDCK involves both extrinsic and intrinsic pathways." *Appl Biochem Biotechnol* 172(1): 497-508.
- Drane, D. P., et al. (1994). "Evaluation of a novel diagnostic test for canine parvovirus." *Vet Microbiol* 41(3): 293-302.
- Duffy, A., et al. (2010). "Hematologic improvement in dogs with parvovirus infection treated with recombinant canine granulocyte-colony stimulating factor." *J Vet Pharmacol Ther* 33(4): 352-356.
- Duffy, A., et al. (2010). "Hematologic improvement in dogs with parvovirus infection treated with recombinant canine granulocyte-colony stimulating factor." *J Vet Pharmacol Ther* 33(4): 352-356.
- Dyer, F. and M. Spagnuolo-Weaver (2006). "Efficacy of vaccination against canine parvovirus." *Vet Rec* 159(18): 605.
- Elia, G., et al. (2005). "Antibody levels and protection to canine parvovirus type 2." *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52(7-8): 320-322.
- Elia, G., et al. (2007). "Detection of infectious canine parvovirus type 2 by mRNA real-time RT-PCR." *J Virol Methods* 146(1-2): 202-208.
- Elia, G., et al. (2012). "Recombinant ELISA using baculovirus-expressed VP2 for detection of antibodies against canine parvovirus." *J Virol Methods* 184(1-2): 98-102.
- Elias, M. A., et al. (2014). "Influence of chemotherapy for lymphoma in canine parvovirus DNA distribution and specific humoral immunity." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 37(5-6): 313-320.
- Eugster, A. K. (1980). "Studies on canine parvovirus infections: development of an inactivated vaccine." *Am J Vet Res* 41(12): 2020-2024.
- Favrot, C., et al. (2000). "Parvovirus infection of keratinocytes as a cause of canine erythema multiforme." *Vet Pathol* 37(6): 647-649.

- Filipov, C., et al. (2011). "Canine parvovirus epidemiology in Bulgaria." *J Vet Diagn Invest* 23(1): 152-154.
- Fiscus, S. A., et al. (1985). "Rapid enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to canine parvovirus." *Am J Vet Res* 46(4): 859-863.
- Fisher, E. W., et al. (1980). "Canine parvovirus infection." *Vet Rec* 107(14): 339-340.
- Florent, G. (1986). "Enzyme-linked immunosorbent assay for single serum diagnosis of canine parvovirus disease." *Vet Rec* 119(19): 479-480.
- Flower, R. L., et al. (1980). "Antigenic differences between canine parvovirus and feline panleucopenia virus." *Vet Rec* 107(11): 254-256.
- Folkers, C., et al. (1982). "Vaccination against canine parvovirus disease." *Vet Rec* 110(10): 235.
- Fritz, T. E. (1979). "Canine enteritis caused by a parvovirus-Illinois." *J Am Vet Med Assoc* 174(1): 3,6.
- Frost, J. W. and G. Klunker (1984). "The use of tissue culture for routine diagnosis of canine parvovirus infection." *Zentralbl Veterinarmed B* 31(8): 623-626.
- Gallo Calderon, M., et al. (2012). "Study of canine parvovirus evolution: comparative analysis of full-length VP2 gene sequences from Argentina and international field strains." *Virus Genes* 44(1): 32-39.
- Gamoh, K., et al. (2005). "Efficacy of an inactivated feline panleucopenia virus vaccine against a canine parvovirus isolated from a domestic cat." *Vet Rec* 157(10): 285-287.
- Gamoh, K., et al. (2003). "Chronological antigenic survey of canine parvovirus in Japan." *Vet Rec* 152(5): 142-143.
- Gamoh, K., et al. (2003). "The pathogenicity of canine parvovirus type-2b, FP84 strain isolated from a domestic cat, in domestic cats." *J Vet Med Sci* 65(9): 1027-1029.

Gardiner, D. (2005). "Canine parvovirus: from not there to everywhere: a historical look at the emergence, media coverage, and vaccine development of canine parvovirus." *Vet Herit* 28(2): 38-45.

Gardiner, D. (2005). "Canine parvovirus: from not there to everywhere: a historical look at the emergence, media coverage, and vaccine development of canine parvovirus." *Vet Herit* 28(2): 38-45.

Glickman, L. T., et al. (1985). "Breed-related risk factors for canine parvovirus enteritis." *J Am Vet Med Assoc* 187(6): 589-594.

Goddard, A. and A. L. Leisewitz (2010). "Canine parvovirus." *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 40(6): 1041-1053.

Goddard, R. D., et al. (1990). "Inactivated canine parvovirus vaccines: an alternative method for assessment of potency." *Vet Rec* 126(20): 497-499.

Godsall, S. A., et al. (2010). "Epidemiology of canine parvovirus and coronavirus in dogs presented with severe diarrhoea to PDSA PetAid hospitals." *Vet Rec* 167(6): 196-201.

Gordon, J. C. and E. J. Angrick (1986). "Canine parvovirus: environmental effects on infectivity."

Gordon, J. C. and W. A. Rogers (1982). "Field evaluation of a canine parvovirus vaccination program, using feline origin modified live virus vaccine." *J Am Vet Med Assoc* 180(12): 1429-1431.

Gore, T. C., et al. (2005). "Three-year duration of immunity in dogs following vaccination against canine adenovirus type-1, canine parvovirus, and canine distemper virus." *Vet Ther* 6(1): 5-14.

Goto, H., et al. (1984). "Comparative studies of physicochemical and biological properties between canine parvovirus and feline panleukopenia virus." *Nihon Juigaku Zasshi* 46(4): 519-526.

Goto, H., et al. (1986). "Biological and physical comparison of mink enteritis virus feline panleukopenia virus and canine parvovirus." *Nihon Juigaku Zasshi* 48(5): 1025-1028.

infection of canine parvovirus in specific pathogen-free cats." *Nihon Juigaku Zasshi* 46(5): 729-731.

Gray, L. K., et al. (2012). "Comparison of two assays for detection of antibodies against canine parvovirus and canine distemper virus in dogs admitted to a Florida animal shelter." *J Am Vet Med Assoc* 240(9): 1084-1087.

Greenwood, N. M., et al. (1995). "Comparison of isolates of canine parvovirus by restriction enzyme analysis, and vaccine efficacy against field strains." *Vet Rec* 136(3): 63-67.

Greenwood, N. M., et al. (1996). "Comparison of isolates of canine parvovirus by monoclonal antibody and restriction enzyme analysis." *Vet Rec* 138(20): 495-49

Guo, L., et al. (2013). "Identification of canine parvovirus with the Q370R point mutation in the VP2 gene from a giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*)." *Virology* 10: 163.

Harper, D. G. and L. Barnard (1984). "Canine parvovirus vaccination efficacy." *Vet Rec* 114(6): 151-152.

Hirasawa, T., et al. (1982). "Prevalence and conversion of canine parvovirus antibody in various dog colonies in Japan." *Nihon Juigaku Zasshi* 44(6): 997-1001.

Hirasawa, T., et al. (1987). "Electron microscopy of CRFK cells infected with canine parvovirus." *Nihon Juigaku Zasshi* 49(5): 765-770.

Hirasawa, T., et al. (1987). "Outbreak of canine parvovirus infection and its elimination in a closed beagle dog colony." *Zentralbl Veterinarmed B* 34(8): 598-606.

Hirasawa, T., et al. (1994). "Sensitive detection of canine parvovirus DNA by the nested polymerase chain reaction." *Vet Microbiol* 41(1-2): 135-145.

Hirasawa, T., et al. (1985). "Multiplication of canine parvovirus in CRFK cells." *Nihon Juigaku Zasshi* 47(1): 89-99.

- Hirasawa, T., et al. (1996). "Detection and genomic analysis of canine parvovirus by the polymerase chain reaction." *Zentralbl Veterinarmed B* 43(9): 545-554.
- Hirayama, K., et al. (2005). "VP2 gene of a canine parvovirus isolate from stool of a puppy." *J Vet Med Sci* 67(1): 139-143.
- Hitchcock, L. M. and J. Scarnell (1979). "Canine parvovirus isolated in UK." *Vet Rec* 105(8): 172.
- Hoare, C. M., et al. (1997). "Immunogenicity of a low-passage, high-titer modified live canine parvovirus vaccine in pups with maternally derived antibodies." *Vaccine* 15(3): 273-275.
- Hong, C., et al. (2007). "Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States." *J Vet Diagn Invest* 19(5): 535-539.
- Horiuchi, M., et al. (1998). "Differences in the evolutionary pattern of feline panleukopenia virus and canine parvovirus." *Virology* 249(2): 440-452.
- Horner, G. W. (1983). "Canine parvovirus in New Zealand: epidemiological features and diagnostic methods." *N Z Vet J* 31(9): 164-166.
- Hueffer, K., et al. (2003). "The natural host range shift and subsequent evolution of canine parvovirus resulted from virus-specific binding to the canine transferrin receptor." *J Virol* 77(3): 1718-1726.
- Hueffer, K., et al. (2004). "[Evolution and host variation of the canine parvovirus: molecular basis for the development of a new virus]." *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 117(3-4): 130-135.
- Iida, H., et al. (1990). "[Effect of maternally derived antibody levels on antibody responses to canine parvovirus, canine distemper virus and infectious canine hepatitis virus after vaccinations in beagle puppies]." *Jikken Dobutsu* 39(1): 9-19.
- Ikeda, Y., et al. (2000). "Predominance of canine parvovirus (CPV) in unvaccinated cat populations and emergence of new antigenic types of CPVs in cats." *Virology* 278(1): 13-19.

- Ikeda, Y., et al. (2002). "Feline host range of canine parvovirus: recent emergence of new antigenic types in cats." *Emerg Infect Dis* 8(4): 341-346.
- Ilott, M. (2006). "Efficacy of vaccination against canine parvovirus." *Vet Rec* 159(21): 722-723.
- Iris, K., et al. (2010). "Factors affecting the occurrence, duration of hospitalization and final outcome in canine parvovirus infection." *Res Vet Sci* 89(2): 174-178.
- Jeoung, S. Y., et al. (2008). "Genetic analysis of VP2 gene of canine parvovirus isolates in Korea." *J Vet Med Sci* 70(7): 719-722.
- Jiang, W., et al. (1998). "Nucleic acid immunization protects dogs against challenge with virulent canine parvovirus." *Vaccine* 16(6): 601-607.
- Joao Vieira, M., et al. (2008). "Canine parvovirus 2c infection in central Portugal." *J Vet Diagn Invest* 20(4): 488-491.
- Johnson, B. J. and A. E. Castro (1984). "Isolation of canine parvovirus from a dog brain with severe necrotizing vasculitis and encephalomalacia." *J Am Vet Med Assoc* 184(11): 1398-1399.
- Jones, M. (2006). "Efficacy of vaccination against canine parvovirus." *Vet Rec* 159(18): 605.
- Ju, C., et al. (2012). "Genome sequence of canine parvovirus strain SC02/2011, isolated from a puppy with severe diarrhea in south China." *J Virol* 86(24): 13805.
- Kantere, M., et al. (2015). "Diagnostic performance of a rapid in-clinic test for the detection of Canine Parvovirus under different storage conditions and vaccination status." *J Virol Methods*.
- Kapil, S., et al. (2007). "Canine parvovirus types 2c and 2b circulating in North American dogs in
- Kaur, G., et al. (2014). "Antigenic typing of canine parvovirus using differential PCR." *Virusdisease* 25(4): 481-487.

Koptopoulos, G., et al. (1986). "Presence of antibody cross-reacting with canine parvovirus in the sera of dogs from Greece." *Vet Rec* 118(12): 332-333.

Kramer, J. M., et al. (1980). "Canine parvovirus: update." *Vet Med Small Anim Clin* 75(10): 1541-1555.

Kumar, M. and S. Nandi (2010). "Molecular typing of canine parvovirus variants by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis." *Transbound Emerg Dis* 57(6): 458-463.

Kumar, M., et al. (2010). "Development of a polyclonal antibody-based AC-ELISA and its comparison with PCR for diagnosis of canine parvovirus infection." *Virol Sin* 25(5): 352-360.

Kusi, I. (1997). "A survey of canine parvovirus-2 in Albania." *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 104(11): 478-480.

Lacheretz, A., et al. (2003). "Diagnosis of canine parvovirus by rapid immunomigration on a membrane." *Vet Rec* 152(2): 48-50.

Larson, L. J. and R. D. Schultz (1997). "Comparison of selected canine vaccines for their ability to induce protective immunity against canine parvovirus infection." *Am J Vet Res* 58(4): 360-363

Larson, L. J. and R. D. Schultz (2008). "Do two current canine parvovirus type 2 and 2b vaccines

Lenghaus, C. (1980). "Canine parvovirus disease: a caution against routine vaccination." *Aust Vet J* 56(10): 511-512.

Lenghaus, C. and M. J. Studdert (1984). "Acute and chronic viral myocarditis. Acute diffuse nonsuppurative myocarditis and residual myocardial scarring following infection with canine parvovirus." *Am J Pathol* 115(2): 316-319.

Lenghaus, C., et al. (1980). "Acute and chronic canine parvovirus myocarditis following

- Llamas-Saiz, A. L., et al. (1996). "Structural analysis of a mutation in canine parvovirus which controls antigenicity and host range." *Virology* 225(1): 65-71.
- Lloyd-Evans, L. P. (1980). "Vaccination and canine parvovirus." *Vet Rec* 106(21): 445.
- Lopez de Turiso, J. A., et al. (1992). "Recombinant vaccine for canine parvovirus in dogs." *J Virol* 66(5): 2748-2753.
- Macartney, L., et al. (1984). "Canine parvovirus enteritis 1: Clinical, haematological and pathological features of experimental infection." *Vet Rec* 115(9): 201-210.
- Macartney, L., et al. (1984). "Canine parvovirus enteritis 2: Pathogenesis." *Vet Rec* 115(18): 453-460.
- Macartney, L., et al. (1984). "Canine parvovirus enteritis 3: Scanning electron microscopical features of experimental infection." *Vet Rec* 115(21): 533-537.
- Macartney, L., et al. (1988). "Studies on canine parvovirus infection: preparation of challenge virus." *Res Vet Sci* 45(2): 170-173.
- Macartney, L., et al. (1988). "Canine parvovirus: interaction between passive immunity and virulent challenge." *Vet Rec* 122(24): 573-576.
- Majer-Dziedzic, B., et al. (2011). "Phylogenetic analysis of canine parvovirus CPV-2 strains and its variants isolated in Poland." *Pol J Vet Sci* 14(3): 379-384.
- Markovich, J. E., et al. (2012). "Effects of canine parvovirus strain variations on diagnostic test results and clinical management of enteritis in dogs." *J Am Vet Med Assoc* 241(1): 66-72.
- Martella, V., et al. (2005). "Immunogenicity of an intranasally administered modified live canine parvovirus type 2b vaccine in pups with maternally derived antibodies." *Clin Diagn Lab Immunol* 12(10): 1243-1245.
- Martella, V., et al. (2004). "A canine parvovirus mutant is spreading in Italy." *J Clin Microbiol* 42(3): 1333-1336.

Martella, V., et al. (2005). "Surveillance activity for canine parvovirus in Italy." *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52(7-8): 312-315.

Martyn, J. C., et al. (1990). "Nucleotide sequence of feline panleukopenia virus: comparison with canine parvovirus identifies host-specific differences." *J Gen Virol* 71 (Pt 11): 2747-2753.

Marulappa, S. Y. and S. Kapil (2009). "Simple tests for rapid detection of canine parvovirus antigen and canine parvovirus-specific antibodies." *Clin Vaccine Immunol* 16(1): 127-131.

Mathys, A., et al. (1983). "Comparison of hemagglutination and competitive enzyme-linked immunosorbent assay procedures for detecting canine parvovirus in feces." *Am J Vet Res* 44(1): 152-154.

Maya, L., et al. (2013). "Phylogenetics analysis of canine parvovirus in Uruguay: evidence of two successive invasions by different variants." *Arch Virol* 158(6): 1133-1141.

McAdaragh, J. P., et al. (1982). "Experimental infection of conventional dogs with canine parvovirus." *Am J Vet Res* 43(4): 693-696.

McCandlish, I. A., et al. (1981). "Canine parvovirus infection." *In Pract* 3(3): 5-14.

McCaw, D. L., et al. (1997). "Early protection of puppies against canine parvovirus: a comparison of two vaccines." *J Am Anim Hosp Assoc* 33(3): 244-250.

McVicar, I. D. and F. McEvoy (1985). "Canine parvovirus vaccination." *Vet Rec* 117(3): 71.

Meers, J., et al. (2007). "Genetic analysis of canine parvovirus from dogs in Australia." *Aust Vet J* 85(10): 392-396.

Meunier, P. C., et al. (1985). "Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: sequential virus distribution and passive immunization studies." *Vet Pathol* 22(6): 617-624.

Meunier, P. C., et al. (1985). "Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: the importance of viremia." *Vet Pathol* 22(1): 60-71.

Meunier, P. C., et al. (1981). "Canine parvovirus in a commercial kennel: epidemiologic and pathologic findings." *Cornell Vet* 71(1): 96-110.

Mildbrand, M. M., et al. (1984). "Rapid detection of canine parvovirus in feces using monoclonal antibodies and enzyme-linked immunosorbent assay." *Am J Vet Res* 45(11): 2281-2284.

Minagawa, T., et al. (1999). "Feline interferon-omega treatment on canine parvovirus infection." *Vet Microbiol* 69(1-2): 51-53.

Miranda, C., et al. (2014). "Canine parvovirus 2c infection in a cat with severe clinical disease." *J Vet Diagn Invest* 26(3): 462-464.

Mittal, M., et al. (2014). "Molecular typing of canine parvovirus strains circulating from 2008 to 2012 in an organized kennel in India reveals the possibility of vaccination failure." *Infect Genet Evol* 23: 1-6.

Mochizuki, M., et al. (2002). "Virologic and serologic identification of minute virus of canines (canine parvovirus type 1) from dogs in Japan." *J Clin Microbiol* 40(11): 3993-3998.

Mochizuki, M. and T. Hashimoto (1986). "Growth of feline panleukopenia virus and canine parvovirus in vitro." *Nihon Juigaku Zasshi* 48(4): 841-844.

Mochizuki, M., et al. (1984). "Fecal examinations for diagnosis of canine parvovirus infection." *Nihon Juigaku Zasshi* 46(4): 587-592.

Mochizuki, M., et al. (1996). "Isolation of canine parvovirus from a cat manifesting clinical signs of feline panleukopenia." *J Clin Microbiol* 34(9): 2101-2105.

Mochizuki, M., et al. (2008). "Recombination between vaccine and field strains of canine parvovirus is revealed by isolation of virus in canine and feline cell cultures." *J Vet Med Sci* 70(12): 1305-1314.

Mohan Raj, J., et al. (2010). "Isolation, molecular characterization and phylogenetic analysis of canine parvovirus." *Infect Genet Evol* 10(8): 1237-1241.

Mohri, S., et al. (1982). "Sero-epidemiologic survey on canine parvovirus infection." *Nihon Juigaku Zasshi* 44(3): 543-545.

Moon, H. S., et al. (2008). "Comparison of the pathogenicity in three different Korean canine parvovirus 2 (CPV-2) isolates." *Vet Microbiol* 131(1-2): 47-56.

Morner, T. and P. Olson (1985). "Canine parvovirus infection demonstrated by immunofluorescence." *Zentralbl Veterinarmed B* 32(5): 337-344.

Mukhopadhyay, H. K., et al. (2012). "Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of canine parvovirus DNA directly in faecal specimens." *Lett Appl Microbiol* 55(3): 202-209.

Mukhopadhyay, H. K., et al. (2014). "Phylogenetic analysis of canine parvovirus partial VP2 gene in India." *Virus Genes* 48(1): 89-95.

Naidu, H., et al. (2012). "Typing of canine parvovirus isolates using mini-sequencing based single nucleotide polymorphism analysis." *J Virol Methods* 181(2): 197-201.

Nakamura, K., et al. (2001). "Pathogenic potential of canine parvovirus types 2a and 2c in domestic cats." *Clin Diagn Lab Immunol* 8(3): 663-668.

Nakamura, M., et al. (2003). "Monoclonal antibodies that distinguish antigenic variants of canine parvovirus." *Clin Diagn Lab Immunol* 10(6): 1085-1089

Nakamura, M., et al. (2004). "A novel antigenic variant of Canine parvovirus from a Vietnamese dog." *Arch Virol* 149(11): 2261-2269.

Nandi, S., et al. (2010). "Molecular characterisation and nucleotide sequence analysis of canine parvovirus strains in vaccines in India." *Vet Ital* 46(1): 69-81.

Nandi, S., et al. (2010). "Occurrence of canine parvovirus type 2c in the dogs with haemorrhagic enteritis in India." *Res Vet Sci* 88(1): 169-171.

- Nandi, S. and M. Kumar (2010). "Canine parvovirus: current perspective." *Indian J Virol* 21(1): 31-44.
- Nara, P. L., et al. (1983). "Systemic and local intestinal antibody response in dogs given both infective and inactivated canine parvovirus." *Am J Vet Res* 44(11): 1989-1995.
- Nelson, C. D., et al. (2008). "Detecting small changes and additional peptides in the canine parvovirus capsid structure." *J Virol* 82(21): 10397-10407.
- Nho, W. G., et al. (1997). "Detection of canine parvovirus in naturally infected dogs with enteritis and myocarditis by in situ hybridization." *J Vet Diagn Invest* 9(3): 255-260.
- Ntafis, V., et al. (2010). "Characterization of Canine parvovirus 2 variants circulating in Greece." *J Vet Diagn Invest* 22(5): 737-740.
- O'Brien, S. E., et al. (1986). "Response of pups to modified-live canine parvovirus component in a combination vaccine." *J Am Vet Med Assoc* 188(7): 699-701.
- Oh, J. S., et al. (2006). "One-step immunochromatography assay kit for detecting antibodies to canine parvovirus." *Clin Vaccine Immunol* 13(4): 520-524.
- Ohshima, T., et al. (2008). "Chronological analysis of canine parvovirus type 2 isolates in Japan." *J Vet Med Sci* 70(8): 769-775.
- Ohshima, T. and M. Mochizuki (2009). "Evidence for recombination between feline panleukopenia virus and canine parvovirus type 2." *J Vet Med Sci* 71(4): 403-408.
- Organtini, L. J., et al. (2015). "Global Displacement of Canine Parvovirus by a Host-Adapted Variant: Structural Comparison between Pandemic Viruses with Distinct Host Ranges." *J Virol* 89(3): 1909-1912.
- Palmer, J. and M. Thornley (2004). "Canine parvovirus outbreaks." *Aust Vet J* 82(12): 720.
- Paradiso, P. R., et al. (1982). "Canine parvovirus: a biochemical and ultrastructural characterization." *J Gen Virol* 62 (Pt 1): 113-125.

Park, S. A., et al. (2012). "Development of a novel vaccine against canine parvovirus infection with

Parker, J. S. and C. R. Parrish (1997). "Canine parvovirus host range is determined by the specific conformation of an additional region of the capsid." *J Virol* 71(12): 9214-9222.

Parker, J. S. and C. R. Parrish (2000). "Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking." *J Virol* 74(4): 1919-1930.

Parrish, C. R. (1995). "Pathogenesis of feline panleukopenia virus and canine parvovirus." *Baillieres Clin Haematol* 8(1): 57-71.

Parrish, C. R. (1999). "Host range relationships and the evolution of canine parvovirus." *Vet Microbiol* 69(1-2): 29-40.

Parrish, C. R., et al. (1988). "Canine host range and a specific epitope map along with variant sequences in the capsid protein gene of canine parvovirus and related feline, mink, and raccoon parvoviruses." *Virology* 166(2): 293-307.

Parrish, C. R., et al. (1991). "Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus." *J Virol* 65(12): 6544-6552.

Parrish, C. R., et al. (1988). "Characterization of a nonhemagglutinating mutant of canine parvovirus." *Virology* 163(1): 230-232.

Parrish, C. R. and L. E. Carmichael (1983). "Antigenic structure and variation of canine parvovirus type-2, feline panleukopenia virus, and mink enteritis virus." *Virology* 129(2): 401-414.

Parrish, C. R. and L. E. Carmichael (1986). "Characterization and recombination mapping of an antigenic and host range mutation of canine parvovirus." *Virology* 148(1): 121-132.

Parrish, C. R. and L. E. Carmichael (1986). "Effectiveness of canine parvovirus vaccines." *J Am Vet Med Assoc* 189(12): 1528-1529.

Parrish, C. R., et al. (1988). "The global spread and replacement of canine parvovirus strains." *J Gen Virol* 69 (Pt 5): 1111-1116.

Parrish, C. R. and Y. Kawaoka (2005). "The origins of new pandemic viruses: the acquisition of new host ranges by canine parvovirus and influenza A viruses." *Annu Rev Microbiol* 59: 553-586.

Parrish, C. R., et al. (1985). "Natural variation of canine parvovirus." *Science* 230(4729): 1046-1048.

Parrish, C. R., et al. (1982). "Canine parvovirus infections in a colony of dogs." *Vet Microbiol* 7(4): 317-324.

Pedroza-Roldan, C., et al. (2015). "Genotyping of Canine parvovirus in western Mexico." *J Vet Diagn Invest* 27(1): 107-111.

Pereira, C. A., et al. (2007). "Selective regimen shift and demographic growth increase associated with the emergence of high-fitness variants of canine parvovirus." *Infect Genet Evol* 7(3): 399-409.

Pereira, C. A., et al. (2000). "Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay." *Vet Microbiol* 75(2): 127-133.

Perez, R., et al. (2012). "Recent spreading of a divergent canine parvovirus type 2a (CPV-2a) strain in a CPV-2c homogenous population." *Vet Microbiol* 155(2-4): 214-219.

Perez, R., et al. (2014). "Phylogenetic and genome-wide deep-sequencing analyses of canine parvovirus reveal co-infection with field variants and emergence of a recent recombinant strain." *PLoS One* 9(11): e111779.

Perez, R., et al. (2007). "First detection of canine parvovirus type 2c in South America." *Vet Microbiol* 124(1-2): 147-152.

Phillips, T. R. and R. D. Schultz (1987). "Failure of vaccine or virulent strains of canine parvovirus to induce immunosuppressive effects on the immune system of the dog." *Viral Immunol* 1(2): 135-144.

- Phromnoi, S., et al. (2010). "Sequence analysis of VP2 gene of canine parvovirus isolates in Thailand." *Virus Genes* 41(1): 23-29.
- Pierson, E. (1980). "Canine parvovirus infection." *Vet Rec* 107(13): 315.
- Pinto, L. D., et al. (2012). "Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010." *Virus Res* 165(1): 29-33.
- Pollock, R. V. (1982). "Experimental canine parvovirus infection in dogs." *Cornell Vet* 72(2): 103-119.
- Pollock, R. V. and L. E. Carmichael (1982). "Dog response to inactivated canine parvovirus and feline panleukopenia virus vaccines." *Cornell Vet* 72(1): 16-35.
- Pollock, R. V. and L. E. Carmichael (1982). "Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer, decline, and interference with vaccination." *J Am Vet Med Assoc* 180(1): 37-42.
- Pollock, R. V. and L. E. Carmichael (1983). "Use of modified live feline panleukopenia virus vaccine to immunize dogs against canine parvovirus." *Am J Vet Res* 44(2): 169-175.
- Pollock, R. V. and M. J. Coyne (1993). "Canine parvovirus." *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 23(3): 555-568.
- Pratelli, A., et al. (2000). "Evaluation of the natural immunity in pups inoculated with a modified-live canine parvovirus type 2b (CPV-2b) strain." *Immunopharmacol Immunotoxicol* 22(3): 451-464.
- Pratelli, A., et al. (1999). "Fatal canine parvovirus type-1 infection in pups from Italy." *J Vet Diagn Invest* 11(4): 365-367.
- Pratelli, A., et al. (2001). "Canine parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody responses in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccine." *Clin Diagn Lab Immunol* 8(3): 612-615.

- Pratelli, A., et al. (2000). "Immunization of pups with maternally derived antibodies to canine parvovirus (CPV) using a modified-live variant (CPV-2b)." *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 47(4): 273-276.
- Prole, J. H. (1980). "Vaccination of greyhounds against canine parvovirus." *Vet Rec* 106(4): 88.
- Puentes, R., et al. (2012). "Isolation and characterization of canine parvovirus type 2C (CPV-2C) from symptomatic puppies." *Braz J Microbiol* 43(3): 1005-1009.
- Qin, Q., et al. (2007). "Sequence analysis of a canine parvovirus isolated from a red panda (*Ailurus fulgens*) in China." *Virus Genes* 34(3): 299-302.
- Rajaonarison, J. J. and E. Rakotondramary (1982). "[Identification of canine parvovirus infections in Madagascar]." *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 35(3): 213-215.
- Reed, A. P., et al. (1988). "Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus." *J Virol* 62(1): 266-276.
- Rhode, S. L., 3rd (1985). "Nucleotide sequence of the coat protein gene of canine parvovirus." *J Virol* 54(2): 630-633.
- Ribeiro, M. C. and J. P. Araujo, Jr. (2009). "Coagglutination for viral DNA preparation of canine parvovirus for molecular diagnosis." *J Virol Methods* 161(2): 305-307.
- Rice, J. B., et al. (1982). "Comparison of systemic and local immunity in dogs with canine parvovirus gastroenteritis." *Infect Immun* 38(3): 1003-1009.
- Rimmelzwaan, G. F., et al. (1989). "Monoclonal anti-idiotypic antibody vaccines against poliovirus, canine parvovirus, and rabies virus." *Methods Enzymol* 178: 375-390.
- Rimmelzwaan, G. F., et al. (1990). "Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on monoclonal antibodies for the serology and antigen detection in canine parvovirus infections." *Vet Q* 12(1): 14-20.

Robinson, W. F., et al. (1980). "Canine parvoviral disease: experimental reproduction of the enteric form with a parvovirus isolated from a case of myocarditis." *Vet Pathol* 17(5): 589-599.

Rypul, K., et al. (2002). "Phylogenetic similarity of the canine parvovirus wild-type isolates on the basis of VP1/VP2 gene fragment sequence analysis." *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 49(3): 142-145.

Sabine, M., et al. (1982). "Canine parvovirus infection in Australia during 1980." *Vet Rec* 110(24): 551-553.

Sagazio, P., et al. (1998). "Antigenic characterization of canine parvovirus strains isolated in Italy."

Schmitz, S., et al. (2009). "Comparison of three rapid commercial Canine parvovirus antigen detection tests with electron microscopy and polymerase chain reaction." *J Vet Diagn Invest* 21(3): 344-345.

Senda, M., et al. (1988). "Canine parvovirus: strain difference in haemagglutination activity and antigenicity." *J Gen Virol* 69 (Pt 2): 349-354.

Siedek, E. M., et al. (2011). "Vaccination with canine parvovirus type 2 (CPV-2) protects against challenge with virulent CPV-2b and CPV-2c." *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 124(1-2): 58-64.

Smith, J. R., et al. (1981). "Vaccination against canine parvovirus." *Aust Vet J* 57(1): 50.

Smith, J. R. and R. H. Johnson (1986). "Observations on the use of an inactivated canine parvovirus vaccine." *Vet Rec* 118(14): 385-387.

Soma, T., et al. (2013). "Analysis of the VP2 protein gene of canine parvovirus strains from

Spibey, N., et al. (2008). "Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus." *Vet Microbiol* 128(1-2): 48-55.

Streck, A. F., et al. (2009). "First detection of canine parvovirus type 2c in Brazil." *Braz J*

- Stucker, K. M., et al. (2012). "The role of evolutionary intermediates in the host adaptation of canine parvovirus." *J Virol* 86(3): 1514-1521.
- Studdert, M. J., et al. (1983). "Aspects of the diagnosis, pathogenesis and epidemiology of canine parvovirus." *Aust Vet J* 60(7): 197-200.
- Sun, Y. L., et al. (2014). "Visual detection of canine parvovirus based on loop-mediated isothermal amplification combined with enzyme-linked immunosorbent assay and with lateral flow dipstick." *J Vet Med Sci* 76(4): 509-516.
- Sutton, D., et al. (2013). "Canine parvovirus type 2c identified from an outbreak of severe gastroenteritis in a litter in Sweden." *Acta Vet Scand* 55: 64.
- Taguchi, M., et al. (2012). "Booster effect of canine distemper, canine parvovirus infection and infectious canine hepatitis combination vaccine in domesticated adult dogs." *Microbiol Immunol* 56(8): 579-582.
- Taguchi, M., et al. (2012). "Effects of body weight on antibody titers against canine parvovirus type 2, canine distemper virus, and canine adenovirus type 1 in vaccinated domestic adult dogs." *Can J Vet Res* 76(4): 317-319.
- Tempesta, M., et al. (1998). "The polymerase chain reaction for the detection of defective interfering canine parvovirus particles." *New Microbiol* 21(4): 353-357.
- Teramoto, Y. A., et al. (1984). "Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, DNA hybridization, hemagglutination, and electron microscopy for detection of canine parvovirus infections." *J Clin Microbiol* 20(3): 373-378.
- Thompson, H. (2006). "Efficacy of vaccination against canine parvovirus." *Vet Rec* 159(17): 570-571; discussion 571.
- Thomson, G. W. and A. N. Gagnon (1978). "Canine gastroenteritis associated with a parvovirus-like agent." *Can Vet J* 19(12): 346.
- Touihri, L., et al. (2009). "Molecular characterization of canine parvovirus-2 variants circulating in Tunisia." *Virus Genes* 38(2): 249-258.

- Truill, P. (2006). "Efficacy of vaccination against canine parvovirus." *Vet Rec* 159(20): 688.
- Truyen, U. (1996). "[Evolution of canine parvovirus: loss and gain of the feline host]." *Tierarztl Prax* 24(3): 316-318.
- Truyen, U. (1999). "Emergence and recent evolution of canine parvovirus." *Vet Microbiol* 69(1-2): 47-50.
- Truyen, U. (2006). "Evolution of canine parvovirus--a need for new vaccines?" *Vet Microbiol* 117(1): 9-13.
- Truyen, U., et al. (1998). "No evidence for a role of modified live virus vaccines in the emergence of canine parvovirus." *J Gen Virol* 79 (Pt 5): 1153-1158.
- Truyen, U. and C. R. Parrish (1992). "Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo." *J Virol* 66(9): 5399-5408.
- Truyen, U., et al. (2000). "[Distribution of antigen types of canine parvovirus in Switzerland, Austria and Germany]." *Schweiz Arch Tierheilkd* 142(3): 115-119.
- Tsao, J., et al. (1991). "The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional
- Uchida, E., et al. (1988). "Clinical, hematological and pathological findings in specific pathogen-free cats and conventional cats experimentally infected with canine parvovirus." *Nihon Juigaku Zasshi* 50(3): 597-604.
- Uwatoko, K., et al. (1995). "Rapid method utilizing the polymerase chain reaction for detection of canine parvovirus in feces of diarrheic dogs." *Vet Microbiol* 43(4): 315-323.
- Waldvogel, A. S., et al. (1991). "Retrospective study of myocardial canine parvovirus infection by in situ hybridization." *Zentralbl Veterinarmed B* 38(5): 353-357.
- Walker, D. (1980). "FPL vaccine and canine parvovirus." *Vet Rec* 107(3): 70.

- Walker, S. T., et al. (1980). "A serological survey of canine parvovirus infection in New South Wales, Australia." *Vet Rec* 106(15): 324-325.
- Wang, H. C., et al. (2005). "Phylogenetic analysis of canine parvovirus VP2 gene in Taiwan." *Virus Genes* 31(2): 171-174.
- Wilhelmsen, C. L. (1982). "Hemorrhagic enteritis and nonsuppurative myocarditis caused by canine parvovirus." *Mil Med* 147(3): 231, 236-237.
- Wilson, N. D. (1980). "Origin of canine parvovirus." *Vet Rec* 106(17): 392.
- Wilson, S., et al. (2014). "Vaccination of dogs with canine parvovirus type 2b (CPV-2b) induces neutralising antibody responses to CPV-2a and CPV-2c." *Vaccine* 32(42): 5420-5424.
- Wilson, S., et al. (2013). "Vaccination of dogs with Duramune DAPPi+LC protects against pathogenic canine parvovirus type 2c challenge." *Vet Rec* 172(25): 662.
- Woldemeskel, M., et al. (2011). "Canine parvovirus-2b-associated erythema multiforme in a litter of English Setter dogs." *J Vet Diagn Invest* 23(3): 576-580.
- Xu, J., et al. (2015). "Phylogenetic analysis of canine parvovirus isolates from sichuan and gansu provinces of China in 2011." *Transbound Emerg Dis* 62(1): 91-95.
- Yi, L., et al. (2009). "[Genetic variation analysis of canine parvovirus VP2 gene in China]." *Bing Du Xue Bao* 25(6): 452-459.
- Yoon, S. H., et al. (2009). "Molecular insights into the phylogeny of canine parvovirus 2 (CPV-2) with emphasis on Korean isolates: a Bayesian approach." *Arch Virol* 154(8): 1353-1360.
- Yule, T. D., et al. (1997). "Canine parvovirus vaccine elicits protection from the inflammatory and clinical consequences of the disease." *Vaccine* 15(6-7): 720-729.
- Zhao, J., et al. (2011). "[Origin and evolution of canine parvovirus--a review]." *Wei Sheng Wu Xue Bao* 51(7): 869-875.

Zhao, Y., et al. (2013). "Genotyping and pathobiologic characterization of canine parvovirus circulating in Nanjing, China." *Virology* 10: 272.

Zhong, Z., et al. (2014). "First isolation of new canine parvovirus 2a from Tibetan mastiff and global analysis of the full-length VP2 gene of canine parvoviruses 2 in China." *Int J Mol Sci* 15(7): 12166-12187.

Zhu, Y., et al. (2014). "Genome Sequence of a Canine Parvovirus Strain, CPV-s5, Prevalent in Southern China." *Genome Announc* 2(1).